

ELIANE APARECIDA SUCHARA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS E
AMOSTRAS AMBIENTAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
GASOSA.**

FLORIANÓPOLIS – SC

Novembro 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS E
AMOSTRAS AMBIENTAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
GASOSA.**

Eliane Aparecida Suchara

Tese de Doutorado, apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Química, Departamento de
Química da Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis

2007

Esta tese foi desenvolvida em parceria entre o

***DEPARTAMENTO DE QUÍMICA da UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA***

e o

***LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE SANTA
CATARINA (LACEN/SC)***

Ó Senhor Deus, tu és o meu defensor e o meu protetor.

Tu és o meu Deus; eu confio em ti.”

Dedico

*Aos meus pais **José e Diva***

*Aos meus irmãos **Eloir e Elucir***

*Ao meu namorado **Nei***

Minha eterna gratidão a vocês...

*“Graças dou por esta vida,
Pelo bem que revelou.
Graças dou pelo futuro
E por tudo que passou.
Pelas bênçãos derramadas,
Pelo amor, pela aflição,
Pelas graças reveladas,
Graças dou pelo perdão.*

*Graças pelo azul celeste
E por nuvens que há também.
Pelas rosas no caminho
e os espinhos que elas tem.
Pela escuridão da noite,
Pela estrela que brilhou,
Pela prece respondida
E a esperança....”*

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por guiar meus caminhos e me carregar nos momentos mais difíceis.
 - À minha família, José, Diva, Eloir, Elucir, Diana e Nei pelo amor, incentivo e por acreditar em mim sempre.
 - Ao meu namorado Nei pelo companheirismo e incentivo
 - Ao Professor Eduardo Carasek da Rocha pela orientação e pelas valiosas contribuições para a realização desse trabalho.
 - Aos atuais e antigos colegas do laboratório 209: Aline, Dilma, Edmar, Érica, Rafael, Jéferson, Joice, Kalia, Rosilene, Vanira e Marcel. Obrigada pela companhia e auxílio.
- Em especial agradeço a:
- À Dilma e ao Edmar, pela ajuda fundamental na reta final de trabalho.
 - À Érica pelo companheirismo durante as disciplinas cursadas.
 - Ao Wiston Luiz Zomkowski, superintendente da saúde, por confiar e possibilitar a realização dessa parceria entre a Universidade e o LACEN-SC.
 - Ao LACEN-SC, em nome do atual Diretor João A. Daniel Filho, e a todos os funcionários pela enorme colaboração para realização desse trabalho.
 - Aos atuais e antigos funcionários e estagiários do Controle de Qualidade de Medicamentos do LACEN, Amistron, Caroline, Ieda, Leandra, Liane, Rita, Ronald e Tatiana pela alegria, auxílio constante e por serem sempre solícitos.
 - À Yeda Heineck Andriane, que embora pelo pouco tempo de contato acreditou e confiou no meu trabalho.
 - Ao Vilson Tribek pela ajuda constante.
 - À Eliane Dalcin, pela amizade e força.
 - Aos funcionários do Laboratório de Toxicologia, Léa e Vanira.
 - À Léa pela amizade e companheirismo sempre.
 - À Vanira por abrir os caminhos até o LACEN.
 - Aos professores e funcionários do Departamento de Química e aos secretários da Pós-graduação de química, Graça e Jadir.
 - A banca examinadora, pelas suas contribuições e por sua participação.
 - A CAPES pela bolsa concedida.
 - Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Saúde - Fundação Osvaldo Cruz e a Ana Carolina Oliveira Costa pelo fornecimento das substâncias de referência.

- A CASAN pelo fornecimento das amostras de água de tratamento de esgoto.
- Aos meus Amigos, Acioli, Adaiane, Claudinei, Diana, Evandro, Fernanda, Graciela, Lucas, Luciana, Maria, Márcio, Denise, Juliana, Patrícia, Paulo, Terezinha, Vera e Viviane.
 - Em especial as minhas amigas Ângela, Fabiana, Jaqueline, Marisa, Rejane e Tânia, que acreditaram e torceram por mim sempre.
- A todos os meus amigos e familiares, muito obrigada!

Gostaria de expressar o meu agradecimento a muitas pessoas que contribuíram para a realização dessa tese. E mesmo as que não citei anteriormente, o meu muito obrigada por cada sorriso, palavra amiga, crítica, contribuição e carinho!!!!

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ÍNDICE GERAL.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XIX

CAPITULO 1

Revisão Bibliográfica.....	01
1.1. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE TESE	02
1.2. FÁRMACO: CONTAMINANTE AMBIENTAL EMERGENTE.....	04
1.2.1. Ocorrência de resíduos de fármacos no ambiente.....	06
1.2.2. Legislação e risco.....	11
1.3. FÁRMACOS ESTUDADOS.....	12
1.3.1. Fármacos <i>anti-hipertensivos</i>	12
1.3.2. Fármacos antiinflamatórios	14
1.3.3. Agentes antiepilépticos e ansiolíticos.....	14
1.3.4. Fármacos anti-histamínicos.....	15
1.4. ANÁLISE DE FÁRMACOS.....	15
1.4.1. Extração e pré-concentração.....	16
1.4.1.1. Extração em fase sólida.....	16
1.4.1.2. Microextração em Fase sólida.....	22
1.4.2. Técnicas cromatográficas.....	29
1.4.2.1. Cromatografia Líquida.....	30
1.4.2.2. Cromatografia Gasosa.....	31
1.4.3. Quantificação.....	31
1.5. PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	33
1.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	37

CAPITULO 2

Objetivos.....	41
----------------	----

2.1. OBJETIVO GERAL.....	42
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	42

CAPITULO 3

Determinação de paracetamol e hidroclorotiazida em urina humana por HPLC: uso da técnica de padronização por adição.	43
3.1. INTRODUÇÃO.....	44
3.2. PARTE EXPERIMENTAL	45
3.2.1. Materiais.....	45
3.2.1.1. Reagentes e Solventes.....	45
3.2.1.2. Padrões.....	45
3.2.1.3. Colunas cromatográficas.....	46
3.2.1.4. Membranas de filtração.....	46
3.2.1.5. Equipamentos.....	46
3.2.2. Método.....	46
3.2.2.1. Coleta das amostras.....	47
3.2.2.2. Preparo das soluções padrão.....	47
3.2.2.3. Estudo das condições cromatográficas.....	47
3.2.2.4. Metodologia analítica.....	47
3.2.2.5. Estudo dos métodos de quantificação.....	48
3.2.2.6. Testes estatísticos.....	50
3.2.2.7. Validação de metodologia.....	50
3.3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	51
3.3.1. Parâmetros analíticos.....	51
3.3.2. Comparação dos procedimentos de padronização.....	54
3.4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	58

CAPITULO 4

Otimização de parâmetros de pré-concentração para determinação de fármacos em água através de extração em fase sólida e cromatografia líquida.....	59
4.1. INTRODUÇÃO.....	60
4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	61
4.2.1. Materiais.....	61

4.2.1.1. Reagentes e Solventes.....	61
4.2.1.2. Padrões.....	61
4.2.1.3. Coluna cromatográfica.....	61
4.2.1.4. Cartuchos para SPE.....	61
4.2.1.5. Membranas de filtração.....	62
4.2.1.6. Equipamentos.....	62
4.2.2. Método.....	62
4.2.2.1. Coleta das amostras.....	62
4.2.2.2. Preparo das soluções padrão.....	63
4.2.2.3. Estudo das condições cromatográficas.....	63
4.2.2.4 Metodologia analítica.....	64
4.2.2.5. Otimização da metodologia	64
4.2.2.6. Validação da metodologia	65
4.3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	66
4.3.1. Estudo das condições cromatográficas	66
4.3.2. Otimização da metodologia para análise de fármacos por SPE.....	69
4.3.3. Validação do método analítico.....	75
4.3.4. Amostras reais.....	79
4.4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	79

CAPÍTULO 5

Extração simultânea de fármacos ácidos e básicos em água residual através da técnica de microextração em fase sólida.	80
5.1. INTRODUÇÃO	81
5.2. PARTE EXPERIMENTAL	82
5.2.1. Materiais.....	82
5.2.1.1. Reagentes e Solventes.....	82
5.2.1.2. Padrões	82
5.2.1.3. Materiais diversos	82
5.2.1.4. Colunas cromatográficas	82
5.2.1.5. Equipamentos	83
5.2.2. Método	83
5.2.2.1. Coleta e preparo das amostras.....	83

5.2.2.2. Preparo das soluções padrão	84
5.2.2.3. Estudo das condições cromatográficas	84
5.2.2.4. Otimização das condições de extração por SPME	86
5.2.2.5. Metodologia analítica para determinação de fármacos	91
5.2.2.6 Validação da metodologia	92
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.3.1. Otimização multivariada do procedimento de SPME	93
5.3.1.1. Otimização multivariada para fármacos ácidos	95
5.3.1.2. Otimização multivariada para fármacos básicos	97
5.3.1.3. Otimização multivariada para a extração de fármacos ácidos e básicos simultaneamente.....	100
5.3.2. Figuras de mérito	102
5.3.3. Aplicação da metodologia para determinação de fármacos ácidos e básicos simultaneamente em amostras reais	104
5.4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	105
 CAPÍTULO 6	
Conclusão Geral	106
Referências Bibliográficas	109

RESUMO

Este trabalho apresenta metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluido biológico e em matrizes ambientais. Na determinação de fármacos em fluido biológico buscou-se enfatizar o método de quantificação do analito. Assim, para a determinação de paracetamol e hidroclorotiazida em urina humana por cromatografia líquida de alta eficiência, foram aplicadas e comparadas as técnicas convencionais de padronização externa e adição do analito com o método proposto de padronização por adição. Verificou-se que a concentração dos fármacos obtida pela padronização por adição não apresentou diferenças das outras técnicas quando avaliados estatisticamente com os testes *t*-Student, ANOVA e análise de variância, mostrando ser de confiança para a determinação dos fármacos nas amostras fortificadas e naturalmente contaminadas. A técnica de padronização proposta mostrou-se simples, econômica quando ao uso de reagentes e de rápida execução quando comparada às outras técnicas testadas. Para a determinação de fármacos em matriz ambiental, foi dada ênfase ao desenvolvimento e otimização de metodologias, utilizando a extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME) para o preparo das amostras. Primeiramente foi otimizada e validada uma metodologia visando à extração dos compostos paracetamol, ácido acetil salicílico, diclofenaco e carbamazepina de amostras de água por SPE e separação e detecção por cromatografia líquida. Os parâmetros pH, vazão e volume de amostra, tipo de sorvente e solvente de eluição, bem como os volumes do solvente foram otimizados univariadamente e permitiram selecionar a melhor condição para o procedimento de extração e concentração. A metodologia otimizada consistiu de amostra com volume de 1000 mL, pH 3, vazão da amostra de 16 mL min⁻¹, sorvente Nexus e eluição do analito com 15 mL da mistura de solvente acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v). Foi encontrada boa faixa de linearidade e valores de recuperação que variaram de 68 ± 15 a 100 ± 13 % para os quatro compostos estudados. Enfim, uma metodologia para a determinação simultânea (em uma única etapa de extração) de fármacos ácidos (ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco) e básicos (diazepam e loratadina) em água através da técnica de SPME e cromatografia gasosa foi desenvolvida. Neste caso, dois pH distintos (pH 2,5 e pH 7,0) foram ajustados durante a etapa de extração. Aplicaram-se as ferramentas multivariadas, planejamento fatorial completo e metodologia de superfícies de resposta, para otimização. A metodologia proposta foi comparada com metodologias nas quais cada classe de fármaco era extraída separadamente. O artifício de modificação do pH durante a extração mostrou-se extremamente eficiente, pois permitiu a extração de compostos com diferentes características físico-químicas,

possibilitando obter valores de limite de quantificação de 0,34; 0,34; 1,43; 0,05 e 0,07 ng mL⁻¹ para ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina, respectivamente. A recuperação encontrada estava na faixa de 67 a 120% para os cinco analitos e a estimativa do desvio padrão relativo variou entre 4,6 a 14%.

ABSTRACT

This work presents analytical methodologies for determination of pharmaceutical compounds in biological fluid and environmental matrixes. For determination of pharmaceutical in urine was emphasized the standardization method of quantitation. The determination of acetoaminophen and hidrochlorothiazide in urine human was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) using conventional standardization methods (external standard and analyte addition) and addition standardization method which is proposed in this work. The three different forms of quantitation were compared through statistical studies tests *t*-Student, ANOVA and variance analysis. The results showed that the proposed addition standardization did not present statistical differences in relation the conventional standardization procedures for determination of the pharmaceuticals in fortified and naturally contaminated urine. The addition standardization technique showed to be simple, fast and economic when to the use of reagents. For determination of pharmaceuticals in environmental matrixes, was given emphasis to the development of methods using solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures. Firstly was optimized and validated a method to determine acetoaminophen, acetylsalicylic acid, diclofenac and carbamazepina of water samples using SPE and HPLC. The parameters sample pH (3), sample flow rate (16 mL min⁻¹) and volume (1000 mL), type of sorbent (Nexus) and solvent of elution (acetonitrile:ethyl acetate 50:50 v/v), as well as the solvent volume (15 mL) were optimized each at a time. It was found good linearity range and recovery values between 68 ± 15 and $100 \pm 13\%$ for the four studied compounds. A analytical method for simultaneous determination (in an only stage of extraction) of pharmaceuticals acids (ibuprofen, fenoprofen and diclofenac) and basics (diazepam and loratadine) in waters using SPME and gas chromatography was developed. In this case, two distincts pH (pH 2,5 and pH 7,0) had been adjusted during the stage of extraction. The method was optimized using factorial design and surface response. The performance of the proposed simultaneous extraction method was compared to two other SPME methods which each class of pharmaceuticals was extracted separately. The procedure using pH modification during the extraction revealed extremely efficient, allowing extraction of compounds with different characteristics physico-chemical, making possible to get limit of quantitation of 0.34; 0.34; 1.43; 0.05 and 0.07 ng mL⁻¹ for ibuprofen, fenoprofen, diclofenac, diazepam and loratadine, respectively. The recovery was in the range of 67 to 120% for the five analytes and the precision of the method (relative standard deviation) varied between 4.6 to 14.5%.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01:	Possíveis rotas de contaminação do meio ambiente pelos fármacos.....	05
Figura 02:	Dispositivo básico de um cartucho de SPE	17
Figura 03:	Etapas básicas da SPE: (A) condicionamento; (B) adição da amostra; (c) lavagem do cartucho e (D) eluição dos analitos.....	18
Figura 04:	Dispositivo básico de SPME.....	23
Figura 05:	Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular.....	35
Figura 06:	Planejamento em estrela para duas variáveis, onde x1 e x2 representam os valores das variáveis estudadas.....	36
Figura 07:	Cromatograma obtido para o fármaco paracetamol ($2,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) em urina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica MICROSORB-MV 100 C18; fase móvel, água/metanol (85:15 v/v); fluxo $1,2 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda 243 nm.....	53
Figura 08:	Cromatograma obtido para o fármaco HCT ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em urina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica, CHROMPACK Inertesil – ODS C18; fase móvel, fosfato monobásico de sódio 0,1 M/acetonitrila (84,5:14,5 v/v) pH 3,0; fluxo 2 mL min^{-1} ; comprimento de onda 254 nm.....	53
Figura 09:	Regressão linear do presente método de padronização: versus (A) adição do analito, versus (B) Padronização externa de paracetamol, versus (c) Padronização por adição do analito, versus (D) padronização externa de HCT, em 10 amostras de cada analito contaminada.....	57
Figura 10:	Fluxograma da metodologia analítica de SPE e HPLC.....	64
Figura 11:	Cromatograma obtido de uma solução padrão na separação de Paracetamol, AAS, Carbamazepina e Diclofenaco por SPE e HPLC. Condições cromatográficas: fase móvel gradiente: acetonitrila: água + 0,1% de CH_3COOH , gradiente inicial de 25 até 85% de acetonitrila em 11min, 85% de acetonitrila: 15% água até 15 min, e 25 de água:85% de acetonitrila até 19 minutos; Coluna C18; Vazão de $1,0 \text{ mL/min}$; Vol. injeção: $20 \mu\text{L}$; detecção: 249 nm;.....	67

Figura 12:	Cromatogramas sobrepostos em dois comprimentos de onda obtidos para solução padrão de Paracetamol, AAS, Carbamazepina e Diclofenaco: leitura em 249 nm na cor verde; leitura em 285 nm na cor laranja. Condições cromatográficas: FM gradiente: acetonitrila: água + 0,1% de CH ₃ COOH; Coluna C18; Vazão de 1,0 mL/min; Vol. injeção: 20 µL..	69
Figura 13:	Resultados obtidos para a otimização da variável <i>pH</i> através de SPE e HPLC.....	70
Figura 14:	Resultados obtidos para a otimização da variável <i>sorvente</i> :.....	71
Figura 15:	Resultados obtidos para a otimização da variável <i>vazão da amostra</i> :.....	72
Figura 16:	Resultados obtidos para a otimização da variável <i>solvente de eluição</i> do analito. Sendo (A) acetonitrila:acetato de etila 50:50; (B) acetona; (C) acetato de etila; (D) acetonitrila; (E) metanol; (F) metanol:acetonitrila 50:50; (G) metanol:acetato de etila 50:50; (H) etanol.....	73
Figura 17:	Resultados obtidos para otimização da variável <i>volume do solvente</i> :.....	74
Figura 18:	Estudo do volume de capacidade do sorvente na extração de fármacos em água.....	75
Figura 19:	Curva analítica do equipamento obtida para os 4 fármacos estudados....	76
Figura 20:	Espectro de massas dos fármacos (A) ibuprofeno, (B) fenoprofeno, (C) diclofenaco, (D) diazepam e (F) loratadina.....	85
Figura 21:	Cromatogramas (TIC) de uma amostra de efluente de tratamento de esgoto fortificada com Ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina. Sendo (A) extração em pH 2,5, (B) extração em pH 7,0 e (C) extração simultânea. A separação foi realizada em coluna capilar VF-5ms com programação de temperatura de 80 °C por 1 min, 15 °C min ⁻¹ até 300 °C, mantendo-se estável por 9 min e injeção no modo splitless.....	86
Figura 22:	Fluxograma Fluxograma da otimização da metodologia para os três grupos de fármacos estudados. Primeiro grupo (mix de fármacos): metodologia para determinação de ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina; segundo grupo (grupo ácido): metodologia para determinação de ibuprofeno, fenoprofeno e	

	diclofenaco; terceiro grupo (grupo básico) metodologia para determinação de diazepam e loratadina.....	90
Figura 23:	Fluxograma das etapas da extração de fármacos ácidos e básicos simultaneamente.....	91
Figura 24:	Resultado obtido para a otimização univariável do tipo de fibra.....	93
Figura 25:	Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para Ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).....	94
Figura 26:	Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para Ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco.....	95
Figura 27:	Superfície de resposta obtida através da matriz Doehlert para Ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco.....	97
Figura 28:	Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para diazepam e loratadina.....	98
Figura 29:	Superfície de resposta obtida através da matriz Doehlert para diazepam e loratadina.....	99
Figura 30:	Superfície de resposta obtida através do planejamento Composto Central para os dois grupos avaliados.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01:	Ocorrência e níveis de fármacos encontrados no ambiente.....	7
Tabela 02:	Características físico-químicas e informações gerais sobre os fármacos estudados.....	13
Tabela 03:	Principais sorventes utilizados em SPE.	20
Tabela 04:	Exemplos das Principais fibras usadas em SPME e suas principais características.	25
Tabela 05:	Ferramentas e medidas utilizadas na validação de métodos analíticos....	38
Tabela 06:	Condições cromatográficas utilizadas para o estudo das técnicas de calibração.....	47
Tabela 07:	Condições analíticas para construção das curvas analíticas para padrão externo e adição do analito	50
Tabela 08:	Parâmetros analíticos obtidos para os fármacos paracetamol (AC) e hidroclorotiazida (HCT).....	52
Tabela 09:	Estudo comparativo entre as três técnicas de padronização para determinação de paracetamol em urina.....	55
Tabela 10:	Estudo comparativo entre as três técnicas de padronização para determinação de HCLT em urina.....	55
Tabela 11:	Resultados obtidos para o teste ANOVA para os fármacos paracetamol e HCT em amostras de urina usando três métodos quantitativas.....	56
Tabela 12:	Parâmetros de relevância estatística para a regressão linear entre os resultados obtidos para as técnicas de padronização em amostras naturalmente contaminadas.	57
Tabela 13:	Variáveis e níveis estudados para a otimização univariada da metodologia para determinação de fármacos por SPE e HPLC.....	65
Tabela 14:	Parâmetros cromatográficos de verificação do sistema obtido para a separação da mistura de fármacos na melhor condição cromatográfica...	67
Tabela 15:	Parâmetros obtidos para a linearidade do equipamento.....	76
Tabela 16:	Parâmetros analíticos para determinação de fármacos por SPE e HPLC.	77
Tabela 17:	Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2^4	87
Tabela 18:	Variáveis e níveis investigados usando o planejamento fatorial completo 2^3	87

Tabela 19:	Planejamento Doehlert para os fármacos ácidos.....	88
Tabela 20:	Planejamento Doehlert para os fármacos básicos.....	88
Tabela 21:	Níveis investigados no planejamento composto central para os 5 compostos estudados.....	89
Tabela 22:	Dados experimentais obtidos pelo planejamento Doehlert para os compostos ibuprofeno. Fenoprofeno e diclofenaco.....	96
Tabela 23:	Dados experimentais obtidos pelo planejamento Doehlert para os compostos diazepam e loratadina.....	99
Tabela 24:	Dados experimentais obtidos para o planejamento composto central dos cinco fármacos estudados.....	101
Tabela 25:	Figuras de mérito obtidas nas 3 metodologias estudadas, incluindo limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear e coeficiente de correlação (R).....	103
Tabela 26:	Recuperação e desvio padrão relativo (RSD) encontrados nas 3 amostras estudadas, sendo duas de efluente de estação de tratamento de esgoto(ETE) e uma de água de esgoto não tratado.....	104

LISTA DE ABREVIACÕES

AAS: ácido acetil salicílico
AS: ácido salicílico
AINes: Agentes antiinflamatórios não-esteróides
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CASAN: Companhia de Água e Saneamento de Santa Catarina
C18: octadecil
CCD: planejamentos Composto Central
CV: coeficiente de variação
DAD: Detector por Arranjo de Diodos
DPR (RSD): Desvio padrão relativo
ETE: Estação de tratamento de esgoto
EMEA: Agência Europeia para produtos medicinais
ECD: Detector por Captura de Elétrons
FL: Detector por Fluorescência
FDA: Food and Drug Administration
FID: Detector por ionização em Chama
FM: Fase móvel
GC (gas chromatography): Cromatografia Gasosa
GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry): Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas
GC-MS-MS: Cromatografia Gasosa acoplada a dois Espectrômetros de Massas em série.
HCT: Hidroclorotiazida
HPLC: (High Performance Liquid Chromatography): Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH: International Conference on Harmonisation
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
LC: (Liquid Chromatography) Cromatografia Líquida
LC-DAD (Liquid Chromatography-Diode Array Detector): Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos
LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): Cromatografia Líquida com detecção por espectrometria de massas
LC-MS-MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetros de Massas em série
LOD (limit of detection): Limite de detecção
LOQ (limit of quantification): Limite de quantificação
MSR Metodologia de superfície de resposta
PPCPs: Produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais
SPE (Solid-phase extraction): Extração em fase sólida
SPME (solid-phase microextraction): Micro-extração em fase sólida
UV- Ultravioleta
UV-VIS: Ultravioleta-visível
USFDA (United States Food and Drug Administration): Agência dos Estados Unidos para Administração de Alimentos e Drogas

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1.1 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE TESE

Tradicionalmente os fármacos não são vistos como um poluente ambiental potencial, mesmo sabendo que muitos são usados em quantidades similares aos produtos agroquímicos e outros poluentes orgânicos. No entanto, a constatação da presença de fármacos no meio aquático e seus possíveis impactos ambientais têm se tornado uma questão de grande importância, não só pelo motivo de serem moléculas extremamente ativas biologicamente, mas também pelo fato de sua produção ocorrer em grande volume. Além disso, o seu uso e diversidade aumentam a cada ano. Além da importância dos níveis de fármacos no meio ambiente, a sua presença nos fluidos biológicos como soro, plasma e urina também têm sido amplamente investigadas, com interesse tanto na área ambiental como na área farmacêutica e de medicina legal.

Para verificação da presença e quantificação de fármacos é necessária a utilização de ferramentas analíticas sensíveis que levem a resultados eficientes e com baixos limites de detecção, além de gerar dados de confiança na identificação de várias moléculas de fármacos. Assim, para a sua determinação é necessária a execução de várias etapas analíticas como: extração, pré-concentração, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação do analito. A extração e/ou pré-concentração de fármacos em água normalmente é realizada através das técnicas de extração em fase sólida ou microextração em fase sólida. A separação, detecção e quantificação desses analitos normalmente é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa.

Visando a investigação de fármacos em diferentes matrizes, neste estudo serão analisados fármacos em (a) matriz biológica dando ênfase na etapa de quantificação de analito e (b) matriz ambiental avaliando as etapas de extração, pré-concentração e detecção.

Visando uma melhor compreensão desse trabalho a organização geral está em capítulos.

O **capítulo (1)** apresenta uma revisão bibliográfica englobando assuntos importantes relacionados à análise de fármacos.

O **capítulo 2** traz os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

O **capítulo 3** aborda uma avaliação da etapa de quantificação do analito, no qual foi aplicado o método de padronização por adição para quantificar os fármacos paracetamol e hidroclorotiazida em urina humana por cromatografia líquida de alta eficiência e comparação

com outras técnicas convencionais de padronização (padronização externa e por adição do analito).

Estudos em matrizes ambientais são descritos nos capítulos 4 e 5.

O **capítulo 4** aborda o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de fármacos antiinflamatórios não-esteróides (paracetamol, AAS e diclofenaco) e do agente antiepiléptico carbamazepina em água empregando extração em fase sólida (SPE) com separação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência e detector ultravioleta (HPLC-UV). Neste estudo as condições de extração e pré-concentração foram otimizadas pelo método univariado.

O **capítulo 5** apresenta o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de fármacos com características ácidas (ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco) e básicas (diazepam e loratadina) em um único procedimento de extração, através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa. Planejamento fatorial completo e metodologia de superfície de resposta, utilizando matriz Doehlert e planejamento composto central, foram utilizados para otimização desta metodologia.

O **capítulo 6** traz às conclusões finais do estudo desenvolvido.

Para finalizar estão apresentadas as referências bibliográficas de todo o trabalho.

1.2 FÁRMACO: CONTAMINANTE AMBIENTAL EMERGENTE

Atualmente, além dos contaminantes prioritários convencionais, especialmente compostos carcinogênicos tóxicos e que manifestam persistência no meio ambiente como os pesticidas, metais tóxicos e hidrocarbonetos poliaromáticos, vêm crescendo a preocupação em estudar inúmeros contaminantes considerados emergentes em amostras ambientais [1]. Pode-se citar como compostos emergentes as toxinas das cianobactérias, agentes de diagnóstico, fragrâncias, surfactantes e seus metabólicos, nitrosaminas, aditivos da gasolina e aditivos industriais, fármacos, produtos de cuidado pessoal, esteróides e muitos outros compostos [1-5]. Esses contaminantes já estão presentes no meio ambiente por um longo tempo, mas a sua importância e presença neste meio, somente agora está sendo elucidada [5]. O interesse crescente na determinação desses contaminantes ocorre pelo fato de que eles não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água [2, 5] e, portanto, estes podem ser candidatos para futuras legislações, dependendo das pesquisas sobre a sua toxicidade e efeitos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana [2].

Dentre esses compostos emergentes, os fármacos vêm recebendo muita atenção em pesquisas ambientais [5-8], pois a poluição por eles provocada é um fenômeno complexo. Estima-se que cerca de 3000 diferentes compostos são usados como constituintes de produtos na medicina humana e veterinária, compreendendo uma grande extensão de moléculas de vários grupos terapêuticos, com diferentes propriedades físico-químicas, estruturas químicas, ação ambiental e muitas vezes de natureza persistente [9, 10]. Assim, o impacto da sua presença em águas ainda é um problema pouco conhecido e os dados existentes sobre a sua biodegradação, toxicidade e destino no meio ambiente são insuficientes [11].

Resíduos de fármacos têm sido encontrados em diversas matrizes [10, 12] e as fontes de contaminação da água por fármacos, sejam eles de consumo humano ou animal, são inúmeras (**Figura 01**). A mais significativa rota de entrada de fármacos no ambiente aquático é através de estações de tratamento de esgoto (ETE) [8]. Quando o esgoto é encaminhado para a ETE este pode ser biodegradado, degradado parcialmente (ex: penicilina) ou ainda permanecer inalterado (ex: clofibrato) [13] contaminando o meio ambiente através de uma variedade de caminhos [6]. Outras fontes destes resíduos são:

- A água de aterro de lixo [6];
- Os resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários [13];
- A agricultura, onde grandes quantidades de drogas veterinárias e de aditivos estão presentes nas rações de criações de animais [6];

- O tratamento terapêutico de grupo de animais no campo e de efluentes de fazendas de criação de peixes [11];
- O esterco utilizado como fertilizantes e também o uso do lodo digestivo proveniente de ETE usado na agricultura. [13];
- Devido a resultado do consumo humano em altas doses [6];
- À persistência de drogas não metabolizadas [14];
- Devido à estrutura polar da maioria dos compostos farmacêuticos. Estes não são significativamente absorvidos no subsolo e podem chegar até aquíferos a partir de águas de superfície contaminadas [15-16];
- A excreção de fármacos diretamente para os rios [11];

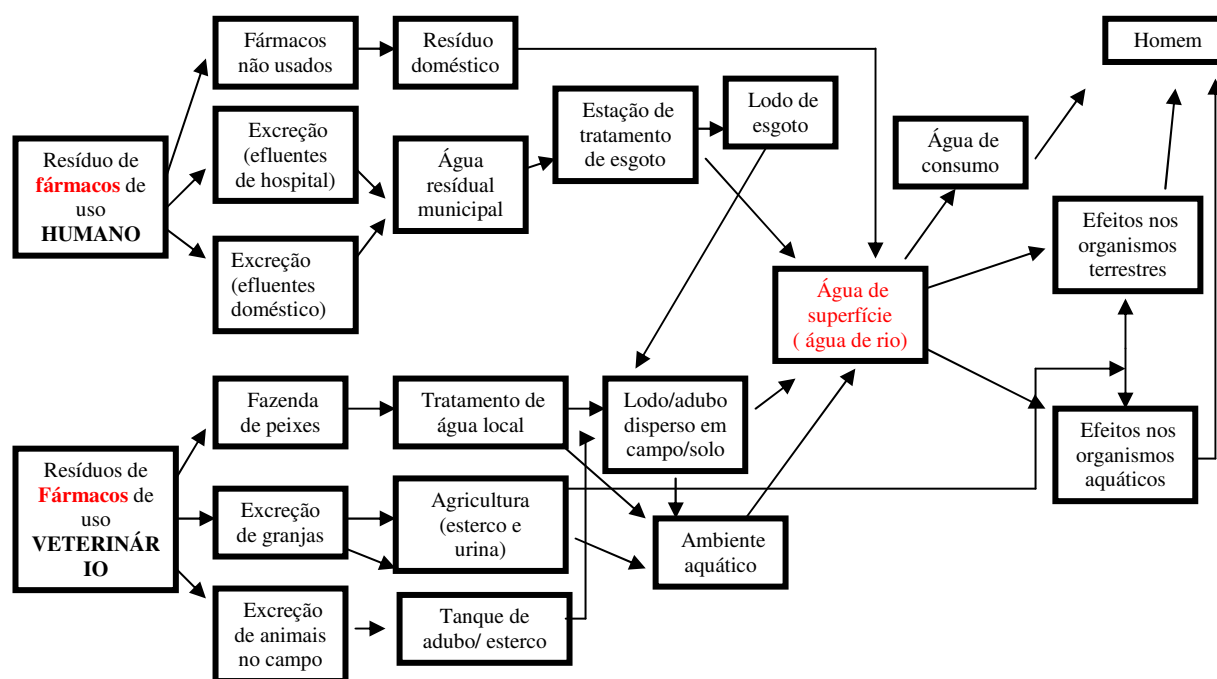


Figura 01: Possíveis rotas de contaminação do meio ambiente pelos fármacos (Adaptada de [6,11,17]) .

A presença de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Este efeito pode ocorrer em qualquer nível da hierarquia biológica, tais como célula, órgão, organismo, população e ecossistema [13], e podem ser observado em concentrações na ordem de ng L^{-1} [17]. Algumas drogas endócrinas ativas possuem um potencial biológico extremamente alto em doses abaixo de $\mu\text{g dia}^{-1}$, assim é muito provável que esses compostos possam também afetar o meio ambiente em baixas

concentrações. Por exemplo, o contraceptivo 17 α -etinilestradiol afeta adversamente a reprodução de zebrafish (*Danio rerio*) em concentrações tão baixas quanto 1 ng L⁻¹ [18].

No entanto, pouco ainda é conhecido sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau [13]. Avaliações sobre o risco ambiental provocado por fármacos não eram freqüentemente requeridos para aprovar o consumo pelos humanos, assim os dados ecotoxicológicos de resíduos de drogas no ambiente aquático existentes ainda são insuficientes. Testes com algas, dafnia e peixes poderiam estimar a toxicidade de resíduos de drogas e contribuir para uma possível avaliação dos riscos ambientais [14]. Um ponto crítico na avaliação do impacto ambiental de fármacos em ambiente aquático é saber se existe um nível elevado dessas substâncias e se estes são suficientes para exercer efeitos adversos nos seres vivos. Esta questão estimula o desenvolvimento de estudos de impacto ambiental causado por diferentes fármacos. A sua ocorrência em águas superficiais e de subsolo demonstra uma necessidade de estudos que determinem os seus efeitos tóxicos frente ao meio ambiente [13].

1.2.1 Ocorrência de resíduos de fármacos no ambiente

Fármacos ácidos são o maior grupo de produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (PPCP) que têm sido detectados em ambiente aquático [7]. O metabólito de antilipêmicos ácido clofíbrico foi o primeiro resíduo de fármaco a ser reportado em esgoto [19] e é o mais frequentemente detectado no mundo todo seja em efluentes de esgoto, água suja, de superfície e potável [14, 16, 20].

Investigações sobre a presença de produtos farmacêuticos no ambiente aquático têm sido realizadas em diversos países, entre eles pode-se citar Áustria, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha e Estados Unidos [6, 11]. As matrizes pesquisadas são principalmente efluentes e afluentes de estação de tratamento de esgoto [7, 12, 14, 16, 21-30] e água de superfície [12, 14, 21, 24-25, 31-38], sendo encontrado em menor número dados sob a contaminação em água potável [21, 38], água do mar [39], estuários [40] e sedimento de rios [41]. Um número pequeno de fármacos ainda é encontrado em água potável doméstica, provavelmente devido à carência de monitoramento e aos limites de detecção muito baixo necessários para a análise de rotina [42]. A **Tabela 01** apresenta um resumo de uma seleção de trabalhos publicados na literatura envolvendo a ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente nos últimos dez anos.

Tabela 01: Ocorrência e níveis de fármacos encontrados no ambiente.

Fármaco	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matriz estudada	País	Ano	Ref
AAS	máx 1,5	efluentes de esgoto	Alemanha	1998	[24]
Paracetamol	máx 0,34	rio e córrego			
Ácido salicílico	máx 6,0	efluentes de esgoto			
	máx 0,14	efluente de esgoto			
	máx 4,1	rio e córrego			
	max 2,1	efluente de esgoto			
Diclofenaco	max 1,20	água de rio	Alemanha	1999	[25]
	máx 3,4	efluente de esgoto			
Ibuprofeno	máx 0,53	rio e córrego			
Sulfametoxazol	máx 0,47	água suja			
	máx 2	efluente de ETE			
	máx 0,48	água de superfície			
Sulfametazina	máx 0,16	água suja	Itália	2000	[43]
Claritomicina	máx 0,26	água de superfície			
Eritromicina	máx 1,70	água de superfície			
	máx 6	efluente de ETE			
Cloranfenicol	0,56	efluente de ETE			
Ácido clofibrico	0,0032 - 0,0053	água para beber			
Diazepam	0,0196 -0,0235	água para beber	Alemanha	2000	[44]
	0,0001 -0,0012	água de rio			
Ibuprofeno	0,2 - 0,4	água suja e água de rio			
Cafeína	máx 1,9	efluentes de ETE	Alemanha	2001	[33]
	máx 0,88	água de rio/córrego			
Diazepam	máx 0,053	efluentes de ETE			
	0,033	água de rio/córrego			
Propilfenazona	0,48	efluentes de ETE			
	0,10	água de rio/córrego			
Nifedipina	0,089	efluentes de ETE	Alemanha	2001	[39]
Carbamazepina,	0,002	água do mar			
Cafeína	0,002				
Propifenazole	0,0006				
Ibuprofeno	85	efluente de esgoto	Espanha	2001	[45]
	2,7	água de superfície			
Ácido salicílico	13,1	efluente de esgoto			
Fluoxetina	máx 0,012	água de córrego	EUA	2002	[46]
Paracetamol	>10				
Lincomicina	máx 0,73				
Sulfatometaxazol	máx 1,9				
Triclosan	máx 2,3				
Diclofenaco	nd – 0,07	efluente de esgoto			
Ibuprofeno	0,30		Canadá	2002	[7]
Tetraciclinas	0,08-0,34	água de rio	Estados Unidos	2003	[34]
Sulfonamidas	0,09-0,18				

Ibuprofeno	2,81–5,77	afluente de esgoto	Espanha	2003	[23]
Naproxeno	0,91–2,10	efluente de esgoto			
	3,50–4,50	afluente de esgoto			
	1,87–2,56	efluente de esgoto			
Paracetamol	< 0,05	efluente de esgoto/	Reino	2003	[12]
Diclofenaco	<0,02 – 0,46	água de superfície	Unido		
Propranolol	<0,01 -0,18				
Ácido clofibríco	< 0,05 ng/l				
Ibuprofen	<0,02 – 3.8				
Eritomicina	0,057 – 1				
Sulfametoxazole	< 0,05				
Trimetoprim	<0,01 -0,27				
Ácido clofibríco	0,005	afluente e efluente de	Grécia	2003	[16]
Propyfenazole	0,01-0,2	esgoto			
Diclofenaco	0,01- 0,56				
Naproxen	0,201-0,107	água de superfície e	USA	2003	[21]
Ácido clofibríco	0,103	água tratada			
Naproxen	0,081- 0,106				
Triclosan	0,01-0,021				
Cafeína	0,098 – 0,176	água de rio e lago	Alemanha	2004	[31]
Diclofenaco	0,026 - 0,067				
Ibuprofeno	0,0059 – 0,032				
Ácido Coflibríco	0,0032 – 0,0076				
Triclosan	nd – 0,0041				
Ácido clofibríco,	< 0,02- 0,111	estuários	Reino	2004	[40]
Diclofenaco,	<0,008-0,195		Unido		
Propranolol	<0,004-0,056				
Ibuprofeno	<0,008-0,928				
Tamoxifen	<0,004- 0,071				
Ácido clofibríco	nd-0,258	água reciclada de	USA	2004	[47]
Ibuprofeno	0,055 -0,101	efluente de esgoto			
Cafeína	nd – 0,280				
Carbamazepina	nd – 0,048				
Estrona	nd – 0,042				
Naproxeno	0,017-0,080	água de rio	Slovenia	2005	[48]
Diclofenaco	0,009-0,049	água de rio			
Ibuprofen	3,59 /0,15	afluente e efluente de	Suécia	2005	[49]
Fenoprofeno	nd/nd	ETE			
Ketoprofeno	0,94/0,33				
Naproxeno	3,65/0,25				
Diclofenaco	0,16/0,12				
Carbamazepina	1.68/1.18				
Trimetropin	0,08/0,040				
Ibuprofeno,	0,150- 2	efluente de trata-	Suíça	2005	[50]
Diclofenaco e		mento de esgoto			
Ác mefenâmico					

Sultametaxozole	máx 1 0,3	afluente de ETE água de rio	EUA	2006	[27]
Trimetoprim	máx 2,1 máx 1,4	água res. Hospital afluente de ETE			
Ofloxacin	máx 5 máx 1	água res. Hospital afluente de ETE			
Ibuprofeno	máx 4,900	água res. Hospital			
AAS	máx 0,115	água de rio	Romania	2006	[37]
Carbamazepina	máx 0,0372				
Diazepam	máx 0,0751				
Triclosan	máx 0,0336				
Cafeína	máx 0,0567				
Paracetamol	<0,05-19,5 <0,05-6,2	afluente de ETE efluente de ETE	Espanha e Croácia	2006	[28]
Diclofenaco	<0,05-0,50 <0,05-0,50	iAfluente de ETE efluente de ETE			
Ibuprofeno	<0,15-1,20 <0,15-1,05	afluente de ETE efluente de ETE			
Propranolol	<0,10-0,38 <0,10-0,52	afluente de ETE efluente de ETE			
Carbamazepina	<0,10-0,95 <0,10-0,60	afluente de ETE efluente de ETE			
Paracetamol	máx 23,5	afluente de ETE	Coréia e	2006	[29]
Carbamazepina	máx 0,145 máx 0,274	efluente de ETE afluente de ETE	Estados Unidos		
Diazepam	máx 0,0023	efluente de ETE			
Diclofenaco	máx 0,045	efluente de ETE			
Ibuprofeno	máx 0,041	efluente de ETE			
Naproxeno	máx 0,053 máx 17,2	efluente de ETE afluente de ETE			
AAS	0,47-19,4	afluente de ETE	Japão	2006	[51]
Ibuprofeno	0,38-1,13				
Cetoprofeno	0,108- 0,369				
Naproxeno	0,038-0,230				
Carbamazepina	0,015-0,270				
Ibuprofeno	máx 4,57	efluente hospitalar	Espanha	2007	[52]
Paracetamol	máx 3,13				
Cafeína	máx 83,2				
Diclofenaco	máx 0,510				
Carbamazepina	máx 0,008				
Ibuprofeno	34-168 0,24-28	afluente de ETE efluente de ETE	Espanha	2007	[30]
Paracetamol	29-246 <LOQ-4,3	afluente de ETE efluente de ETE			
Diclofenaco	0,2-3,6 0,14-2,2	afluente de ETE efluente de ETE			
Carbamazepina	0,12-0,31 0,11-0,23	afluente de ETE efluente de ETE			

Embora a preocupação em verificar a presença de fármacos no meio ambiente seja motivo de trabalhos científicos a nível mundial, no Brasil existem poucos dados na literatura [13-14, 38, 53] sobre a ocorrência dessas substâncias em amostras ambientais.

No estado do Rio de Janeiro, em 1997, foi desenvolvida uma pesquisa buscando verificar a presença de resíduos de fármacos no meio ambiente [14]. Resíduos de reguladores de lipídeos, antiinflamatórios e metabólitos de algumas drogas foram detectados. A concentração média de resíduos presentes em efluentes de ETE foi de 0,1–1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em esgoto cru foram encontrados resíduos na extensão de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo as maiores concentrações encontradas para indometacina (0,95 $\mu\text{g L}^{-1}$); cofibrato (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e bezofibrato (1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). A concentração encontrada em amostras de rios foi em média de 0,02 - 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valor máximo até 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi verificado também que a presença de resíduos de drogas em águas naturais está correlacionada com a poluição pelos resíduos de águas municipais. Os resíduos de drogas detectados na investigação provavelmente derivam de eliminação humana via excreção [14].

Em outro estudo desenvolvido no ano de 1997, Ternes et al. [53] investigaram a presença de estrogênios em estações de tratamento municipal de esgoto na Alemanha, Canadá e no Brasil. No Brasil foram coletadas amostras da ETE da Penha, no município do Rio de Janeiro, e foi verificada a presença de resíduos de estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos em esgoto bruto. Os estrogênios 7 β -estradiol e estrona foram determinados nas concentrações de 0,02 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

No ano de 2006, foi realizada uma avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas, SP através da determinação de interferentes endócrinos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal [38]. Dentre os compostos monitorados os frequentemente detectados nas águas superficial e potável foram cafeína (1-106 $\mu\text{g L}^{-1}$), dietil e dibutilftalato (0,2-3 $\mu\text{g L}^{-1}$), estradiol (1,8-6 $\mu\text{g L}^{-1}$), etinilestradiol (1-3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), progesterona (1,2-4 $\mu\text{g L}^{-1}$), bisfenol A (2-64 $\mu\text{g L}^{-1}$), colesterol (9-301 $\mu\text{g L}^{-1}$) e coprostanol (5-41 $\mu\text{g L}^{-1}$). Amostras de esgoto bruto e tratado também apresentaram concentrações muito próximas dos hormônios sexuais, indicando a ineficiência do tratamento empregado na ETE para remoção dos mesmos. Quando analisadas amostras de esgoto bruto e esgoto tratado para o fármaco diclofenaco foram encontrados níveis de $2,87 \pm 0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto bruto e $1,78 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto tratado. Para o ibuprofeno os níveis encontrados em esgotos bruto e tratados foram de $54,2 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $48,4 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já para o fármaco paracetamol foi obtido níveis de $18,1 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto bruto e $5,89 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto tratado. Verificou-se uma redução de 10,7, 38 e 67,5% para

ibuprofeno, diclofenaco e paracetamol, respectivamente, sendo portanto esses compostos somente parcialmente removidos durante o tratamento biológico. Na análise de águas superficiais, ibuprofeno e paracetamol estavam abaixo do limite de quantificação (LOQ) em todas as amostras. Já para diclofenaco, apesar de geralmente estar abaixo do LOQ do método, foi encontrado níveis de até $5,9 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Na análise de água potável apenas cafeína, colesterol e sibutilftalato foram detectadas.

1.2.2. Legislação e risco

A presença de fármacos no meio ambiente representa riscos ainda pouco conhecidos e poucas normas existem para regular a sua presença.

Os Estados Unidos regulamentam produtos farmacêuticos no meio ambiente através da Agência dos Estados Unidos para Administração de Alimentos e Drogas (USFDA). Essa regulamentação ocorre através de processos de revisão ambiental requerido para novas drogas submetidas ao FDA [54]. No entanto essa avaliação ambiental como pré-requisito para o registro de novos fármacos somente foi solicitada nos últimos anos [11]. Contudo a USEPA não tem uma regulação nacional primária de água de beber para os PPCPs [54]. Na Europa normas redigidas para avaliação do risco ambiental estão disponíveis já há alguns anos e, em 2005, normas mais recentes foram disponibilizadas. A novidade dessas normas foi o requerimento para testes de ecotoxicidade crônicos preferencialmente ao agudo, reconhecendo que a maioria dos compostos farmacêuticos ativos pode apresentar a longo prazo, efeitos crônicos em baixos níveis [54]. Segundo a Agência Européia para Produtos Medicinais (EMA), se o valor de concentração ambiental predito encontrado estiver abaixo de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ o risco para o ambiente pelo produto medicinal é considerado improvável. Acima de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, análise bruta do efeito ambiental deve ser executada [10, 55].

A Diretriz orientadora do conselho da União Européia (81/852/EEC) para segurança no meio ambiente estabelece que a concentração de fármacos veterinários no meio ambiente não deve exceder a valores de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ no solo e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em água suja [56].

Limites toxicológicos para 13 fármacos em água foram estabelecidos em pesquisa desenvolvida por Muller J. J. A. na Holanda no ano de 2002 [57]. Esses limites foram baseados sobre 10% da dose máxima diária aceitável ou para o limite máximo permitido para resíduo de fármacos veterinários em leite, considerando um peso médio de uma pessoa de 60 kg e a dose diária de 2 litros de água. Foram estabelecidos os seguintes limites para fármacos em água para beber: paracetamol, $150 \mu\text{g L}^{-1}$; sulfametoxazol, $75 \mu\text{g L}^{-1}$; carbamazepina, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; metoprolol, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; diclofenaco, $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$; bisoprolol, $1 \mu\text{g L}^{-1}$; bezafibrate, $35 \mu\text{g L}^{-1}$.

L^{-1} ; eritromicina, $15 \mu g L^{-1}$; fenofibrate, $50 \mu g L^{-1}$; ácido acetil salicílico, $25 \mu g L^{-1}$; ibuprofeno, $150 \mu g L^{-1}$; ácido clofibríco, $30 \mu g L^{-1}$; cloranfenicol, limite de quantificação do método tão baixo quanto possível.

1.3 FÁRMACOS ESTUDADOS

Os fármacos constituem uma classe de compostos de grande importância para o homem e podem ser definidos como substâncias químicas de constituição conhecida e determinada que podem ter aplicação como preventivo, curativo ou como agente de diagnóstico. Estes podem ser usados com a finalidade de: fornecer elementos carentes ao organismo, como vitaminas, sais minerais e hormônios; prevenção de doença ou infecção; combater infecções; bloqueio temporário de uma função normal; correção de uma função desregulada; desintoxicação do organismo e agentes auxiliares de diagnóstico [18].

Os fármacos estudados nesse trabalho (**Tabela 02**) são amplamente consumidos pela população e pertencem à classe dos anti-hipertensivos (hidroclorotiazida), agentes antiinflamatórios não-esteróides (ácido acetil salicílico, paracetamol, diclofenaco, ibuprofeno e fenoprofeno), antiepilépticos (carbamazepina), ansiolíticos (diazepam) e anti-histamínicos (loratadina).

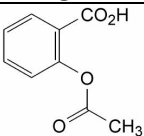
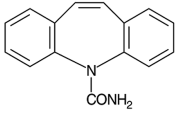
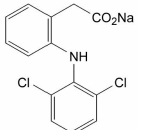
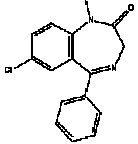
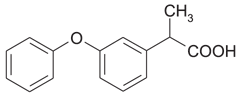
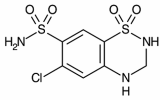
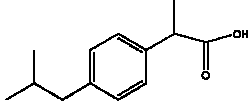
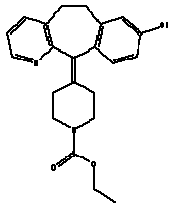
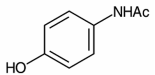
1.3.1 Fármacos *anti-hipertensivos*

Os fármacos *anti-hipertensivos* em uso podem ser divididos em seis grupos: diuréticos; inibidores adrenérgicos; vasodilatadores diretos; inibidores da enzima conversora de angiotensina; bloqueadores dos canais de cálcio; antagonistas do receptor AT_1 da angiotensina II. Amplamente utilizado, o grupo dos *diuréticos* são fármacos empregados principalmente no alívio de distúrbios, edemas e no controle da hipertensão [58, 61]. Os diuréticos são divididos em: tiazídicos (clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida, indapamida SR); de alça (bumetamida, furosemida, piretanida) e poupadores de potássio (amilorida, espironolactona, trianteno) [58].

O princípio ativo *hidroclorotiazida* (HCT) pode estar disponível sozinho ou em combinação com outros fármacos [62], é eficaz por via oral, absorvido pelo trato gastro intestinal e excretado na urina [59]. É um dos medicamentos dessa classe mais fornecidos pelo Sistema Único de Saúde. Também os diuréticos, inclusive a HCT, reduzem a massa muscular de atletas, diminuem a concentração de outros agentes de doping e promovem a

redução da excreção de metabólitos de drogas, por isso foram banidos dos jogos olímpicos desde 1988 [63, 64].

Tabela 02: Características físico-químicas e informações gerais sobre os fármacos estudados [59-61].

FÁRMACO (CAS) ^a	GRUPOS [59;61] ^b	FÓRMULA QUÍMICA/ MM	ESTRUTURA QUÍMICA	pKa [60] ^b
Ácido acetil salicílico (50-78-2)	Analgésico, antiinflamatório e antipirético	C ₉ H ₈ O ₄ (180,2)		3,6
Carbamazepina (298-46-4)	Anticonvulsivante Antiepilético	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O (236,3)		7,0
Diclofenaco sódico (15307-79-6)	Antiinflamatório	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂ (318,1)		4,2
Diazepam (439-14-5)	Ansiolítico e Antiepilético	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O (284,7)		3,3
Fenoprofeno (31879-05-7)	Analgésico, antiinflamatório e antipirético	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ (242,3)		4,5
Hidroclorotiazida (58-93-5)	Anti-hipertensivo diurético	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂ (297,7)		8,6-9,9
Ibuprofeno (15687-27-1)	Analgésico, antiinflamatório e antipirético	C ₁₃ H ₁₈ O ₂ (206,3)		4,4
Loratadina (79794-75-5)	Anti-histamínicos	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ (382,9)		5,0
Paracetamol (103-90-2)	Analgésico e antitérmico	C ₈ H ₉ NO ₂ (151,2)		9,5

^a Número de Registro no Chemical Abstracts Service; ^b Referência bibliografica

1.3.2 Fármacos antiinflamatórios

Os agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os fármacos mais utilizados de todos os agentes terapêuticos. Esses incluem uma diversidade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas e apresentam três tipos principais de efeitos: antiinflamatório, analgésico e antipirético. Os AINEs constituem um dos grupos de fármacos mais frequentemente detectado em amostras de água [65]. Seu enorme consumo, adicionado a sua excelente solubilidade em água e incompleta remoção do esgoto durante o sistema de tratamento convencional tem causado a sua presença no ambiente aquático [21].

Os AINEs podem ser divididos em 12 grupos de compostos, sendo os mais utilizados os salicilatos, como exemplo o ácido acetil salicílico (AAS), derivados do p-aminofenol (paracetamol), derivados propiônicos (ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno), derivados do ácido fenilacético (diclofenaco), derivados de oxicans (piroxicam), entre outros [66-67].

O AAS e o ácido salicílico (AS) estão entre os primeiros fármacos sintetizados. O AAS é um dos fármacos mais consumidos no mundo inteiro, pois além de sua indicação como antiinflamatório, também inibe a agregação plaquetária, sendo importante na terapia do infarto do miocárdio [66].

O N-(4-hidroxifenil) acetamida (*paracetamol*) é um dos analgésicos e antipiréticos não narcóticos mais utilizados no mundo, possui apenas ação antiinflamatória fraca [66].

O *Diclofenaco* corresponde ao ácido 2,6-diclorofenilaminobenzenoacético. É usado nas formas livre, de dietilamônio, de sal potássico, de resinato, de sal sódico, e associado a colestiramina. Sua importância está no uso como anti-reumático e antiinflamatório [61].

Os derivados de ácidos arilpropiônicos têm seu mecanismo de ação relacionado à inibição das prostaglandinas [61], são de baixa toxicidade e de fácil aceitação pelos pacientes. O composto **ibuprofeno** (α -metil-4-(2-metilpropil) ácido benzenoacético) é derivado do ácido fenilpropiônico é um dos fármacos mais utilizados no mundo inteiro. **Fenoprofeno** (α -metil-3-fenoxibenzenoacético) é derivado do ácido benzenoacético e sua eficácia é semelhante ao AAS [61].

1.3.3 Agentes antiepilépticos e ansiolíticos

Os principais agentes antiepilépticos são: fenitoína, carbamazepina, valproato, etossuximida, fenobarbital, diazepam, clonazepam e clobazam. A epilepsia é um distúrbio muito comum que afeta 0,5 a 1% da população [66]. A **carbamazepina** (5H-dibenz[b,f]azepino-5-carboxamida) é quimicamente derivada dos agentes antidepressivos

tricíclicos. Sua indicação isoladamente ou em associação com outros anticonvulsivantes é eficaz no tratamento inicial para epilepsia, em crises parciais (especialmente a complexas) e no distúrbio maníaco-depressivo, entre outras doenças [58].

Os ansiolíticos são usados no controle de neuroses e tensão e segundo a sua estrutura química podem ser divididos em três classes: carbamato de propanodiol e compostos relacionados, benzodiazepina e compostos diversos. O benzodiazepínico **diazepam** (7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1, 4-benzodiazepin-2-ona), além de ser eficiente em certos tipos de epilepsia é eficaz e muito utilizado no tratamento de ansiedade e tensão [58].

Nessas duas categorias a carbamazepina e o diazepam são os compostos mais frequentemente detectados e amplamente consumidos em diversos países europeus, geralmente estando na lista dos 20 fármacos mais consumidos [68].

1.3.4 Fármacos anti-histamínicos

Os anti-histamínicos são usados primeiramente no controle de certas infecções de fundo alérgico, mas apenas como paliativos [58]. Estes podem ser classificados como anti-histamínicos, glicocorticóides e outros fármacos. A **loratadina** é um exemplo de anti-histamínico tricíclico potente de ação prolongada, com atividade seletiva, antagônica, nos receptores H_1 periféricos. Apresenta efeito sedativo e atividade anticolinérgica menos intensa e ausência de efeitos antieméticos e gastrintenais. É indicado para o alívio dos sintomas associados com rinite alérgica, tais como: coriza, espirros e prurido nasal, ardor e prurido ocular [61].

1.4 ANÁLISE DE FÁRMACOS

As baixas concentrações ambientais de fármacos (na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ ou pg g^{-1} a ng g^{-1}) [69] associadas a matrizes complexas (efluente e afluente de esgoto, água de superfície, sedimento) exigem investimento sobre o trabalho analítico, para determinação eficiente desses compostos. Acrescenta-se o fato de que muitas drogas são parcialmente metabolizadas no corpo humano antes da excreção, e, esses metabólitos também podem ser perigosos ao meio ambiente, e assim tem a necessidade de serem incluídos nas investigações. Assim, o desafio é desenvolver e validar métodos analíticos que possam determinar baixas concentrações de fármacos e seus metabólitos em matrizes ambientais complexas [17].

Progressos rápidos no desenvolvimento de procedimentos analíticos para análise de fármacos têm sido facilitados, pela existência de considerável perícia na análise de resíduos

de pesticidas. Estratégias usadas com sucesso na rotina da análise de traços de pesticidas podem ser rapidamente aplicadas para resíduos de fármacos [70].

A análise de fármacos compreende basicamente as etapas de extração e pré-concentração do analito, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação dos analitos.

1.4.1 Extração e pré-concentração

Muitos contaminantes estão presentes no meio ambiente ao nível de traços, exigindo o uso de técnicas que possibilitem pré-concentrar os analitos da matriz para adequação ao sistema de detecção [71]. Para a extração e/ou pré-concentração de fármacos em água são utilizadas várias técnicas, sendo as mais comuns: extração em fase sólida (SPE) [7, 12, 14, 16, 21-23, 26, 27, 31-33, 36, 39-41, 45, 72] e a microextração em fase sólida (SPME) [65, 73-76]. As técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas, para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais à saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras por tempo [77].

1.4.1.1 Extração em fase sólida

A SPE é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [71] e suas inúmeras aplicações somente são possíveis devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e mecanismos de separação.

Na análise de amostras ambientais a SPE tem sido muito utilizada na extração e pré-concentração de fármacos, pesticidas organoclorados, organofosforados e nitrogenados, clorofenóis, ftalatos, sulfonatos aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros analitos [39].

A técnica de SPE consiste na separação líquido-sólido baseado nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. A SPE emprega sorventes recheados em cartuchos nas formas de discos ou seringa. A eluição da amostra ocorre por gravidade ou pressão com o auxílio de uma seringa ou bomba a vácuo. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50-500 mg de sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula. Na forma de disco, estes são constituídos de matrizes de PTFE (teflon)

ou fibras de vidro, flexíveis, embebidas ou impregnadas com a fase estacionária [77, 78]. O esquema básico de um cartucho de SPE está apresentado na **Figura 02**.

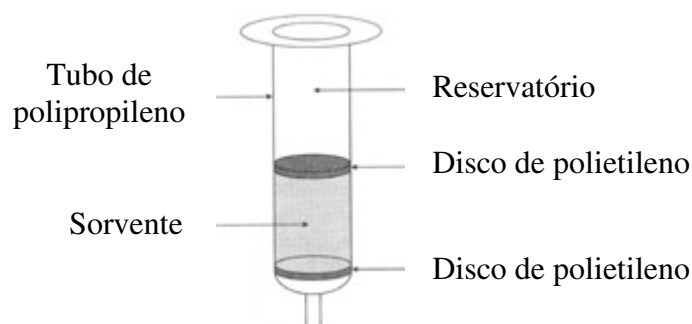


Figura 02: Dispositivo básico de um cartucho de SPE [78].

O sistema de extração em fase sólida pode ser realizado em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema fora da linha a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor como qualquer outra amostra. Já no sistema em linha a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios [79].

Os diferentes modos de operação na SPE podem ser classificados em: (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito; (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes e não pré-concentrar os analitos; (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito e (d) estocagem da amostra muito usada para evitar o transporte de grandes volumes de amostras [78].

As etapas envolvidas na SPE (**Figura 03**) podem ter pequenas variações dependendo do modo de operação, mas basicamente são divididas em [78, 80]:

- Condicionamento do cartucho: ativação do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra, para deixar os sítios ativos disponíveis, sendo que o material contido no cartucho não pode secar. A secagem pode criar vários problemas, como caminhos preferenciais, comprometendo a separação.

- Introdução da amostra: dependendo do volume de amostra (μL até L) pode ser feita com pipeta, micropipeta ou seringa. A transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa e lenta para ter resultados reprodutíveis.
- Limpeza da coluna: lavagem com solvente para retirar os interferentes, mas o solvente não deve possuir força para retirar o analito.
- Eluição e coleta do analito: ideal eluir com pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise.

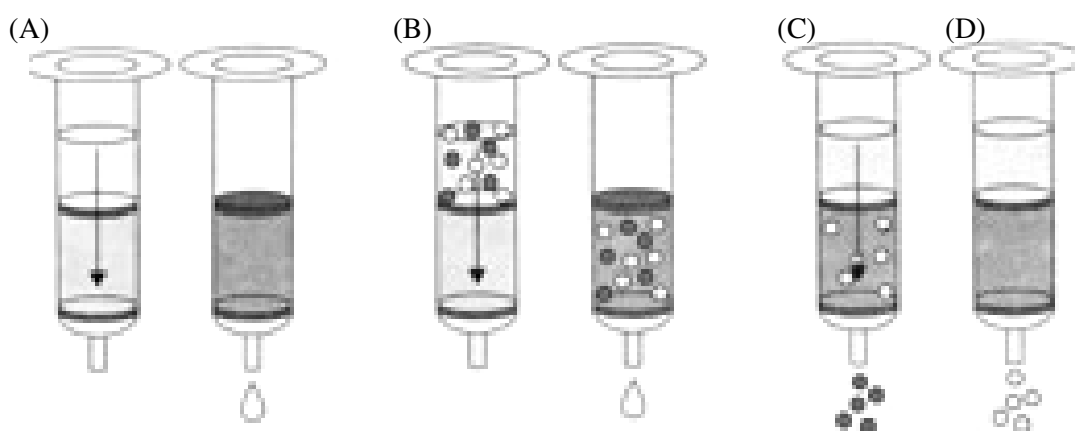


Figura 03: Etapas básicas da SPE: (A) condicionamento; (B) adição da amostra; (C) lavagem do cartucho e (D) eluição dos analitos [78].

Os mecanismos de separação usados em SPE são os mesmos da cromatografia líquida: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho [78].

A **adsorção** é muito utilizada na separação de compostos polares. Dentre os adsorventes mais usados, encontram-se a sílica ($(\text{SiO}_2)_n\text{-OH}$), alumina ($(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$) e silicato de magnésio - florisil® ($\text{Mg}_3\text{Al}_2(\text{SiO}_4)_3$). A sílica é utilizada para propósitos gerais, enquanto florisil® é muito empregada em análise de pesticidas, no entanto este é o mais polar e assim poderá provocar adsorção irreversível do analito de interesse em sua superfície. A sílica gel possui uma superfície ligeiramente ácida que permite a retenção de compostos básicos, enquanto que a superfície básica da alumina é apropriada para a adsorção de compostos de caráter ácido.

A extração em fase sólida, utilizando materiais preparados para apresentarem o mecanismo de **partição**, foi uma extensão natural das fases estacionárias equivalentes em cromatografia líquida. Quase todas as fases que empregam partição em SPE são preparadas a partir da sílica utilizada em processos de adsorção, onde geralmente a sílica reage com um

derivado clorado do grupo siloxano, ligando o grupo alquílico (R) do reagente à estrutura básica da sílica. A escolha do grupo R definirá se a fase preparada será polar ou fase normal (R= OH, CN, NH₂) ou apolar, e assim fase reversa (R=C18, C8, C2).

A **troca iônica** é geralmente empregada para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em soluções aquosas. Os compostos básicos são usualmente retidos por intermédio de uma fase sólida, consistindo de um trocador forte de cátions (SCX) do tipo SO₃⁻ aprisionado a estrutura básica da sílica, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions (SAX) do tipo N⁺(CH₃)₃. Dessa forma ocorrerá uma forte atração entre o analito e o trocador de íons de carga oposta. Os principais fatores que influenciam a separação por troca iônica são: pH, seletividade do contra-íon, força iônica, solvente e vazão da amostra.

A **exclusão por tamanho** tem sido utilizada para eliminar compostos indesejáveis da amostra por intermédio de um mecanismo físico de separação, similar a uma filtração. A fase sólida é formada por um polímero (formado de unidades de glicose e epiclorigirina), cujo tamanho de poros é bem controlado, de forma a permitir a entrada de moléculas pequenas do analito e excluir as maiores indesejáveis.

Para escolha da fase sólida apropriada, uma grande variedade de sorventes está disponível comercialmente e estas apresentam similaridades aos usados na cromatografia líquida (**Tabela 03**). Os grupos mais freqüentemente usados como sorventes a base de sílica podem ser divididos, dependendo do solvente de condicionamento e eluição, nas categorias: *fase reversa* (sorvente é menos polar que o solvente de eluição); *fase normal*, (solvente é menos polar que o sorvente) e troca iônica [79].

Estudos visando desenvolver fases de SPE com aplicações mais específicas constantemente são desenvolvidos. Um exemplo são as fases poliméricas, as quais possuem maior capacidade do que as de sílica e a seletividade é usualmente superior às obtidas com as fases derivadas da sílica gel [81]. Sorventes para SPE baseados em polímeros são tipicamente compostos de ligações altamente entrecruzadas de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB ou SDB). Assim como a sílica, a polaridade da superfície de SDB pode ser modificada pela adição de vários grupos funcionais [82]. Os sorventes poliméricos são recomendados para substâncias de média à alta polaridade, nos quais eles podem apresentar recuperação maior que em sorventes de alquilsílica de FR ou em extração líquido-líquido [83].

Hilton e Thomas em 2003 [12] utilizaram diferentes tipos de sorventes para análise de 13 fármacos (sulfametoxazol, trimetoprim, eritromicina, paracetamol, ibuprofeno, ácido

clofibrato, diclofenaco, propranolol, entre outros) em efluentes de tratamento de esgoto e água de superfície. Os autores avaliaram os cartuchos Isolute ENV, Isolute C18, Isolute C8, OASIS HLB e OASIS MCX, Varian Bond Elut e Phenomenex Strata X e verificaram que os cartuchos Varian Bond Elut C18 e Phenomenex Strata X foram os mais efetivos para análise dos analitos estudados, sendo que estes cartuchos de SPE foram selecionados para futuras investigações. Considerando as diferentes propriedades físico-químicas dos compostos analisados, a recuperação usando o cartucho Strata X foi tipicamente maior que 60% e foi considerada como sendo a melhor fase extratora para a maioria dos compostos analisados. Na Eslovênia, Kosjek *et al.* [48] determinaram resíduos de fármacos antiinflamatórios em amostras de água. Os analitos foram concentrados através de sorventes Strata X e a recuperação obtida ficou entre 84 e 104% para todos os compostos exceto diclofenaco.

Tabela 03: Principais sorventes utilizados em SPE [77,78,82].

Polaridade do solvente	Sorvente	
Polar	Cianopropilsilano	CN
	Diolsilano	2OH
	Aminopropilsilano	NH ₂
Moderadamente polar	Sílica	SI
	Florisil	FL
	Alumina	AL
Não polar	Octadecilsilano	C18
	Octilsilano	C8
	Etilsilano	C2
	Metilsilano	C1
	Fenilsilano	PH
Troca Iônica	Benzenossulfonilpropilsilano	SCX
	Sulfonilpropilsilano	PRS
	Carboximetilsilano	CBA
	Dietilaminopropilsilano	DEA
	Trimetilaminopropilsilano	SAX
	N-Propilenodiaminossilano	PSA
Covalente	Ácido fenilborônico	PBA

Em um estudo comparativo entre diferentes tipos de sorventes poliméricos, realizado por Weigel et al. no ano de 2004 [31], foram avaliadas as habilidades de cada sorvente em extrair fármacos ácidos, básicos e neutros de amostras de água e subsequente análise por cromatografia líquida ou gasosa. Foram testados 7 tipos de sorventes: 3 sorventes PSDVB “não funcionalizados” (Bakerbond SDB-1, Lichrolut EN, Chromabond HR-P), dois sorventes funcionalizados PS-DVB de alta área superficial (Isolut Env+, Chromabond EASY) e os dois co-polímeros compostos de ambos monômeros lipofílicos e hidrofílicos (OASIS HLB, absolut Nexus) de baixa área superficial. Os resultados encontrados mostraram que os fármacos carbamazepina, N-dietil-3-toluamida e cafeína foram quantitativamente recuperados (90-100 %) em todos os sorventes investigados, com exceção do sorvente Nexus para a cafeína (14 %). Já para o fármaco paracetamol, baixa recuperação foi obtida em todos os sorventes (0 - 72 %), provavelmente devido a sua grande solubilidade em água. Para os analitos ácidos, melhores resultados foram obtidos com OASIS HLB, recuperação quantitativa para bezafibrate, ibuprofeno e diclofenaco e ainda 83% para ácido clofibrico. O sorvente OASIS HLB foi seguido pelo sorvente Absetut Nexus com recuperações de 70-90% para a maioria dos ácidos, exceção do ácido clofibrico (23%). Isto está de acordo à baixa eficiência de extração deste sorvente para compostos hidrofílicos, paracetamol e cafeína. Para os três analitos básicos (fluoxetina, metoprolol e propranolol) foi observada recuperação em torno de 90-100% para os co-polímeros hidrofílicos e lipofílicos e nos demais sorventes recuperação de 70% ou mais, com exceção do sorvente Isolut Env e Chromabond HR-P [31]. Na Suíça no ano de 2001, Ollers *et al.* [32] investigaram a presença de fármacos neutros e ácidos em águas naturais também através de sorvente polimérico, Waters Oasis HLB. As recuperações obtidas foram entre 71 e 118%, comprovando assim a eficiência da extração. Em 2006, Brown *et al.* [27] também utilizaram cartuchos Waters Oasis HLB, porém para a determinação de antibióticos em efluentes hospitalares, residenciais e de estação de tratamento de esgoto.

Alguns trabalhos utilizando sorvente C18 para determinação de fármacos em diferentes matrizes aquosas podem ser encontrados na literatura. Stumpf *et al.*, em 1999 [14], utilizaram cartuchos C18 para determinação de resíduos de fármacos polares (AAS; diclofenaco, ácido clofibrico, ibuprofeno, indometacina, entre outros) em esgoto e água natural no Estado do Rio de Janeiro. Ternes e Stumpf, 1999 [53], também utilizaram cartuchos C18 para determinação de estrogênios em efluentes de esgoto de estação de tratamento municipal e a recuperação média encontrada para a metodologia excedeu 75 %. Na Alemanha, Ternes e Bonerz, no ano de 2001 [84], determinaram fármacos neutros (cafeína, propifenazona, 4 aminoantipirina, diazepam, glibenclamida, nifedipina, omeprazol e

oxifenbutazona) de água de rio e água residual de lixo, através do uso de sorvente C18 com recuperação média dos analitos geralmente excedendo a 80%. Na Grécia, no ano de 2003, Koutsouba *et al.*, analisaram resíduos de fármacos polares (ibuprofeno, ácido clofibrico, diclofenaco e propifenazona) em efluente de esgoto e obtiveram recuperação média entre 67 e 90 % para os compostos analisados. Bendzs *et al.*, em 2005 [49] investigaram a ocorrência e a persistência de fármacos ácidos de diferentes classes terapêuticas (antiinflamatórios, reguladores de lipídeos, drogas antiepilépticas, antibióticos e β -bloqueadores) em amostras ambientais também através do uso de sorvente C18.

Algumas desvantagens também são apresentadas com relação à técnica de SPE. Esta minimiza o uso de solventes orgânicos, mas requer grandes volumes de amostra (0,5-2 L), o qual necessita ser filtrado, sendo esta etapa consumidora de tempo, principalmente no caso de amostras de água de esgoto que contêm altos níveis de partículas suspensas. Além do mais, vários reagentes derivatizantes não são compatíveis com solventes orgânicos usados para eluir compostos ácidos de sorvente de SPE. Assim o extrato deve ser evaporado até *secura* antes da derivatização e uma vez completada essa reação o excesso de reagente derivatizante tem que ser removido [85]. Moeder *et al.*, [44] também citam como desvantagem o acúmulo de substâncias da matriz no sorvente de SPE, necessitando de uma etapa de limpeza adicional e pelo fato da otimização da etapa de enriquecimento e de limpeza deve ser separada, esta pode levar a um longo tempo de análise. Deve-se considerar que o cartucho pode ser usado uma única vez (principalmente em amostras muito sujas) e apresenta baixa reprodutibilidade.

1.4.1.2 Microextração em Fase sólida

Apesar de originalmente desenvolvida para análise de compostos voláteis e semivoláteis em amostras ambientais, como micropoluentes orgânicos em água [78, 86], a SPME tem sido aplicada a vários campos, como análise de aromas e flavorizantes em frutas, voláteis no ar, fármacos em fluidos biológicos [74, 86-93], fármacos em água [65, 44, 73, 74-75, 94-96], impurezas em fórmulas farmacêuticas [74, 97], entre outras aplicações. Até pouco tempo a sua aplicação estava diretamente relacionada à GC, no entanto o seu uso com HPLC tem se tornado uma excelente alternativa para análise de compostos semi e não voláteis [98].

A SPME baseia-se na sorção dos analitos por uma fibra de sílica modificada quimicamente (**Figura 04**) com posterior dessorção térmica dos analitos em um cromatógrafo a gás. Assim na extração a seção recoberta com o material sorvente (polímeros ou sólidos adsorventes) é colocada diretamente em contato com a amostra ou ao seu espaço confinante (*headspace*) onde irá ocorrer sorção das espécies de interesse presentes na amostra. A

quantidade da extração depende da partição ou adsorção da espécie de interesse entre a fase extratora, imobilizada sobre a fibra e a matriz. A seguir a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do GC, onde os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica [78].

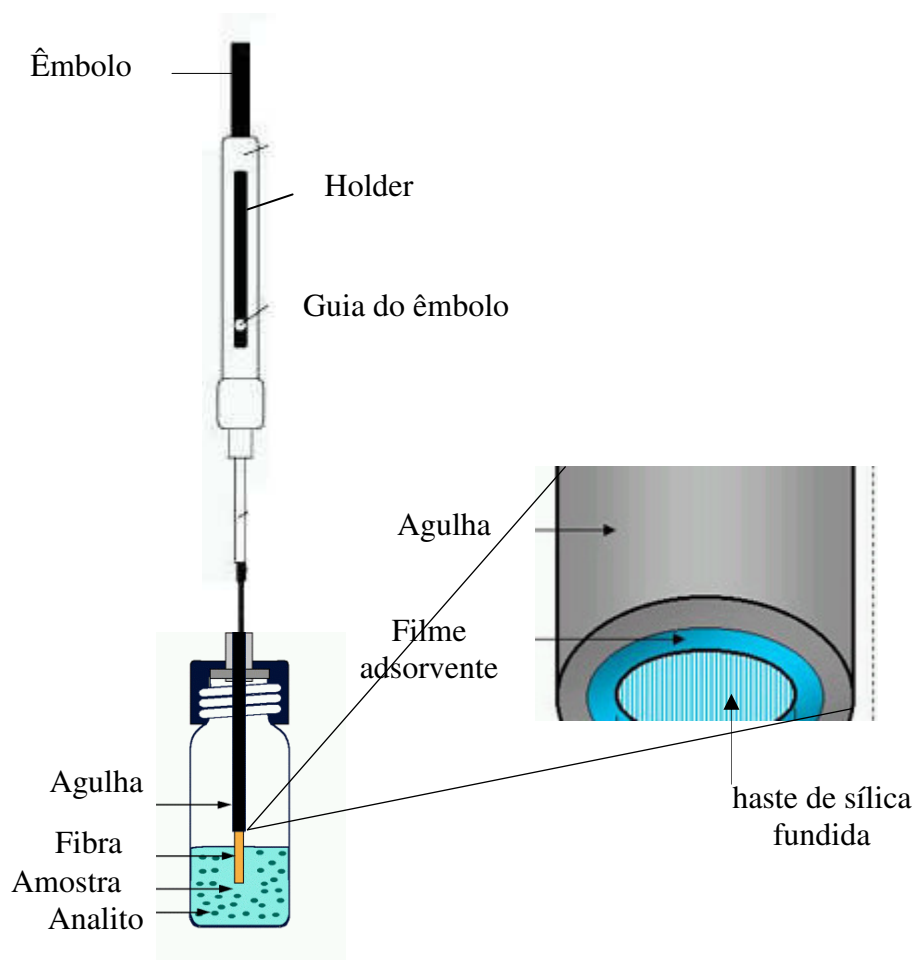


Figura 04: Dispositivo básico de SPME

A eficiência da extração é determinada pelo particionamento do analito entre a matriz da amostra e a fase extratora, assim quanto mais elevada a afinidade do analito pela fase de extração em relação a matriz, maior será a quantidade de analito extraída. A partição é controlada pelas propriedades físico-químicas do analito, da matriz da amostra e da fase extratora. A partição do analito entre essas duas fases pode ser expressa pela constante de distribuição k , onde $k = \text{concentração do analito na fibra} / \text{concentração do analito na fase aquosa}$ [74].

Os principais parâmetros a serem otimizados e controlados em SPME são: escolha do revestimento da fibra; temperatura de extração; tempo de extração; pH; força iônica do meio; velocidade de agitação e tempo de dessorção [78, 86].

- Escolha da fibra

A escolha do tipo da fibra é limitada por aquelas disponíveis comercialmente (com exceções de fibras desenvolvidas em laboratório). A escolha do recobrimento a ser usado na extração vai depender da natureza química das espécies em estudo. A seleção do recobrimento é baseada na polaridade e volatilidade dos compostos. As constantes de distribuição das espécies de interesse e a espessura do recobrimento influenciam na detectabilidade do procedimento analítico [100]. Para análise de fármacos, todos os tipos de revestimento de fibra disponíveis comercialmente têm sido usados [86]. A **Tabela 04** mostra as principais fibras disponíveis comercialmente, espessura do revestimento, temperatura de dessorção e aplicação de cada fibra.

- Ajuste da matriz (pH e força iônica)

Geralmente a matriz deve ser ajustada para aumentar a recuperação da extração do analito sobre a fibra, tanto no modo direto quanto no modo headspace. A determinação do pH é importante, pois as drogas possuem um grupo de dissociação pH-dependente, e é somente na forma não dissociada que ele poderá ser extraído pelo recobrimento da fibra extratora [74]. Recuperação de analitos básicos é aumentada pelo pH básico e a recuperação de analitos ácidos é aumentada pelo pH ácido.

O conteúdo do sal pode afetar também a recuperação na extração. Adição de sal, como cloreto de sódio pode melhorar a recuperação quando os métodos convencionais de extração são usados [74], principalmente para os analitos mais polares. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fibra [78]. No entanto, em alguns casos envolvendo analitos altamente polares ou passíveis de sofrer dissociação iônica em meio aquoso, este aumento da força iônica pode provocar uma diminuição da eficiência da extração.

Tabela 04: Exemplos das Principais fibras usadas em SPME e suas principais características [102].

FASE ESTACIONÁRIA	SIGLA	ESPESSURA DO FILME (μm)	ΔT^a ($^{\circ}\text{C}$)	APLICAÇÃO GERAL
Polidimetilsiloxano	PDMS	100	200-270	Apolar, volátil (GC/LC)
		30	200-270	Apolar, volátil e semi-volátil (GC/LC)
		7	220-320	Apolar, semi-volátil e não volátil (GC/LC)
Poliacrilato (PA)	PA	85	220-310	Polar, uso geral (GC/LC)
Carbowax-divinilbenzeno	CW/DVB	65	200-260	Polar, volátil (GC)
Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno	PDMS/DVB	65	200-270	Polar (GC)
		60	----	LC
Carboxen-PDMS	CAR/PDMS	75	240-300	Volátil, gasosos, traços (GC)
		85		
Carbowax –resina template	CW-TPR	50	----	Polar (LC)
Divinilbenzeno – carboxen- PDMS	PDMS-DVB-CAR	30	----	Ampla faixa de polaridade (C_3 a C_{20}) (GC)
		50		

^a faixa de temperatura indicada para dessorção

- Método de extração

Os dois principais modos de operação em SPME são a extração direta e a extração via headspace. Para matrizes aquosas "limpas" as duas alternativas devem ser verificadas. Além desses dois modos pode-se usar a extração indireta, onde é utilizada uma membrana protetora sobre a fibra, a fim de protegê-la no caso de análise de amostras extremamente sujas, como fluídos biológicos [78].

No modo de extração direto, o recobrimento da fibra (a fase sólida) é inserido diretamente na amostra e os analitos são transportados da amostra para a fase extratora. Para acelerar o processo, emprega-se agitação mecânica a fim de transportar os analitos do meio da solução para a vizinhança da fibra. Para amostras gasosas, a convecção natural do ar é suficiente para facilitar o rápido equilíbrio, já para matrizes aquosas, técnicas mais eficientes de agitação, mecânica ou sonificação, são necessárias. O modo de extração direto é indicado para analitos com características de média e baixa volatilidade e em matrizes líquidas e gasosas [78]. Para análise de fármacos, a maioria dos trabalhos tem sido feita usando imersão direta, embora extração por *headspace* tenha sido usada para drogas voláteis como as anfetaminas ou para metabólitos voláteis [86].

No modo de extração via *headspace*, preparação da amostra é livre de solvente, a fibra de sílica fundida recoberta com polímeros orgânicos líquidos é introduzida no espaço confinante acima da amostra e entre o septo do vial no frasco de extração. Assim a fibra não entra em contato com a amostra, os analitos têm de ser transportados através da barreira de ar antes de atingirem o recobrimento da fibra [78]. Os analitos volatilizados são extraídos e concentrados no revestimento, sendo essa transferida até o instrumento analítico para dessorção e análise. Essa modificação encurta o tempo de extração e facilita a aplicação do método de SPME para análises de amostra sólidas [99]. Também a extração via headspace protege a fibra de possíveis danos provocados por interferentes de elevada massa molar ou baixa volatilidade presente nas amostras, como materiais húmicos (amostras ambientais) e proteínas (amostras biológicas) [78]. O modo de extração headspace é a técnica de escolha se os analitos são voláteis ou podem se tornar voláteis com moderado aquecimento da amostra [86, 99].

- Tempo de extração e agitação da amostra

O tempo de extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio dos analitos entre as fases (recobrimento da fibra e a amostra) seja estabelecido. Sendo um processo de partição, a quantidade máxima a ser extraída será atingida quando o equilíbrio for

estabelecido. Para os compostos que possuem coeficientes de partição menor, o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio com a fibra é longo [78, 103]. Embora a SPME tenha uma sensibilidade máxima no ponto de equilíbrio, o equilíbrio completo não é necessário devido à relação linear entre a quantidade do analito extraído pela fibra e a concentração inicial na amostra em condições de não-equilíbrio. A otimização da agitação é fundamental para incrementar a taxa de transferência de massa e abreviar o tempo de extração. A agitação magnética, por sua simplicidade, é a mais utilizada. Uma agitação eficiente aumenta a velocidade da extração dos analitos [74, 104].

- Temperatura da extração

A temperatura tem dois efeitos opostos na extração com SPME, aumentando a temperatura, aumenta-se o coeficiente de difusão dos analitos e por outro lado, como o processo de extração é exotérmico, o aumento da temperatura representa uma redução no coeficiente de distribuição dos analitos [103]. Ou seja, em temperaturas maiores o coeficiente de difusão do analito em água será menor e assim o tempo de extração também será menor, porém temperaturas elevadas podem diminuir o coeficiente de distribuição entre a fase estacionária e o analito.

- Condições de dessorção

As condições de dessorção podem afetar significativamente a análise por SPME. Esta técnica apresenta um processo lento de dessorção que pode ser acelerado pelo uso de fibras de baixa espessura e um “*liner*” com uma entrada com furo pequeno [104, 105].

Na literatura são relatados alguns trabalhos que visam determinar fármacos através da técnica de SPME.

Em 1998, foi realizada uma das primeiras investigações de ibuprofeno através de SPME, com fibra PA de 85 μm , sem derivatização e determinação por GC-MS. O limite de detecção foi de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram encontrados níveis de ibuprofeno na faixa de 0,1-3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de água tratada e não tratada obtidas de efluentes e afluentes de estações de tratamento de água municipal na Alemanha [94].

Moeder *et al.* no ano de 2000 [44] investigaram a presença de fármacos (ibuprofeno, ácido clofibrico, paracetamol, cafeína, fenazona, gemfibrozil, naproxeno, carbamazepina, indometacina, propranolol, entre outros) e nonilfenóis em água de efluente de rio através de

SPME com detecção por GC-MS. Foram utilizados as fibras PA, PDMS-DVB e Carbowax-DVB. Foi verificado que embora os recobrimentos mais polares, PA e PDMS-DVB, sejam os mais apropriados para todas as substâncias investigadas, o rendimento da extração para fármacos é 100 vezes menor do que para fenóis. Somente o ibuprofeno igualou os resultados de extração obtidos para fenóis. O recobrimento Carbowax-DVB aumenta a seletividade com a presença de moléculas n-heterocíclicas, como carbamazepina e indometacina. O limite de detecção foi de $0,1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com a fibra PA. Os autores concluíram que SPME é uma técnica que pode ser usada na investigação de fármacos e outros compostos em amostras reais de água.

Carpinteiro *et al.* em 2004 [65] determinaram fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno, tolfenâmico e diclofenaco) em amostras de água, através da extração com fibras de PA $65 \mu\text{m}$, derivatização sobre a fibra com N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) e determinação por GC-MS, obtendo limite de quantificação de $12-20 \text{ ng L}^{-1}$. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, foi comparada as técnicas de SPE e SPME para a extração de AINEs em água. Observou-se que para a SPME, a qual evita o uso de solventes orgânicos e a derivatização era realizada depois da extração, o limite de detecção encontrado foi ao nível de ng L^{-1} (volume da amostra 22 mL), sendo este similar ao obtido quando realizado por SPE com volume da amostra de 1000 mL [73].

Estrogênios (dietilstilbestrol, estrona, 17β -estradiol, 17β etinilestradiol e mestranol) também são objetos de estudo para extração por SPME e detecção por GC-MS em amostras de água de esgoto e de superfície. Foram utilizadas fibras de PA e derivatização sobre a fibra com MTBSTFA. O limite de quantificação, entre $0,2-3 \text{ ng L}^{-1}$, foi semelhante ao obtido por outras técnicas de extração, como SPE [95]. Braun *et al.* [96] aplicaram a técnica de SPME com detecção por GC-MS para determinação de 17α etinilestradiol em amostras de água usando fibras de PA. As condições otimizadas foram 1 g de cloreto de sódio, amostra com volume de $9,5 \text{ mL}$, pH ajustado para 2, tempo de extração de 1 hora a 30°C sob uma agitação fixa a 500 r.p.m. , atingindo limite de detecção de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$.

Hall e Brodbelt [75], aplicaram a técnica de SPME (fibra carbowax-DVB) e GC-MS para determinação de barbitúricos (barbital, butalbital e butabarbital, amobarbital, pentobarbital, secobarbital, hexobarbital e fenobarbital) em soluções aquosas. O limite de detecção foi de 1 ng mL^{-1} e a linearidade na faixa de $10-100 \text{ ng mL}^{-1}$. Os autores verificaram que a extração de barbitúricos por SPME pode ser estendida a amostras de natureza complexa, como a urina, pois os resultados quantitativos obtidos nesta matriz podem ser comparados àqueles encontrados convencionalmente por SPE.

Uma desvantagem da técnica de SPME é o fato da fibra ser frágil mesmo quando protegida fora da amostra, além desta poder ser danificada por um acúmulo de materiais não volatilizáveis das amostras. Também o processo de extração pode ser relativamente lento devido a falhas na agitação ou difusão para trazer os analitos na posição da fibra e uma boa reprodutibilidade requer que o equilíbrio esteja estabelecido [106].

1.4.2 Técnicas cromatográficas

A análise de fármacos requer ferramentas analíticas sensíveis e eficientes para providenciar dados de confiança na separação, identificação e quantificação de várias moléculas [10]. As técnicas cromatográficas mais utilizadas para análise de fármacos em amostra ambiental e biológica são a cromatografia líquida (LC) [2, 6-7, 25, 33, 40-41, 45 72,76] e a cromatografia gasosa (GC) [9, 14, 16, 21-23, 26, 30-32, 39, 47, 52], sendo que a decisão entre usar a LC ou GC é usualmente baseada nas características físico-químicas do analito [21].

As duas técnicas oferecem detectores bastante eficientes para uma detecção adequada dos analitos. Para análises por HPLC os detectores mais comuns são o detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), detector por Arranjo de Diodos (DAD) e detector por Fluorescência (FL). Na GC tem-se o detector por ionização em chama (FID), detector de nitrogênio-fósforo (NPD) e detector de captura de elétrons (ECD). Além desses detectores pode-se destacar o uso do espectrômetro de massa (MS) e espectrômetro de massa em série (MS²), bastante utilizados nas duas técnicas cromatográficas.

O sistema de detecção mais empregado, em análise ambiental, nos dois tipos de cromatografia é a espectrometria de massa (MS), devido a sua capacidade de além de quantificar, também identificar analitos. A MS é uma das técnicas mais importantes de análise molecular, devido ao seu potencial de fornecer informações de massa molar, bem como a estrutura do analito. A base da espectrometria de massas é a produção de íons, que são subsequentemente separados ou filtrados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e detectados. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da m/z [26].

GC-MS, GC-MS², LC-MS e LC-MS² têm se mostrado ferramentas indispensáveis para investigação de fármacos e PPCPs em matrizes ambientais [69]. Embora a determinação de fármacos ácidos em amostras ambientais por LC-MS possa ser empregada com sucesso, a

técnica de GC-MS é mais usada devido ao fato de ser mais difundida e estar mais disponível em laboratórios que analisam amostras ambientais. Além disto, acrescenta-se o fato de LC-MS ser um instrumento de alto custo [16] e existir relatos de problemas com supressão de sinal, quando amostras reais são analisadas [16, 23]. Assim, a maior vantagem em se usar a CG-MS é o fato que os modos de ionização utilizados (elétron ionização ou ionização química) são geralmente menos afetados pela matriz da amostra do que o modo de ionização usado em LC-MS [70].

1.4.2.1. Cromatografia Líquida

A necessidade de técnicas com a habilidade de separar e analisar amostras complexas tem motivado constante inovação na área da cromatografia, e dentre outras a técnica HPLC, disponível desde 1969, tem se destacado. Sua popularidade resultou de sua separação conveniente de um grande grupo de amostras, velocidade e níveis de detecção nanomolar. Hoje, esta técnica é usada em diversas áreas inclusive na pesquisa farmacêutica, para purificação sintética ou de produtos naturais, caracterizar metabólitos, avaliar ingredientes ativos, impurezas, produto de degradação, testes de dissolução, em estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos entre outros [60].

A HPLC é um método físico-químico de separação, no qual a separação resulta de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida ou com líquido polar ou apolar ligado (chamada estacionária) recheada no interior de uma coluna e uma fase móvel que atravessa a fixa contida na coluna. Assim a fase móvel proveniente de um reservatório de solvente é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica. A análise inicia quando a amostra é introduzida à coluna por meio de uma válvula de injeção. A partir desta, a amostra é empurrada para a coluna pela fase móvel, onde ocorrerá a separação [107, 108].

Após uma separação eficiente é necessário o uso de um método de detecção sensível. Para determinação de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} a HPLC tem usado os detectores DAD, UV e FL, no entanto, devido a diluição e a degradação dos fármacos, níveis muito baixos são esperados e assim para atingir limite de detecção na extensão de ng L^{-1} e também para realizar uma análise confirmatória, métodos de detecção sensíveis como detecção por massa são essenciais [84]. Devido a sua especificidade e seletividade, a técnica de LC-MS-MS é bem aplicada para analisar compostos polares e termolábeis em amostras ambientais [7].

A LC é utilizada na análise de fármacos pelo fato de não necessitar volatilizar o composto, não correndo assim o risco de perder o analito e também pelo fato de não

necessitar o uso de soluções derivatizantes, as quais geralmente são substâncias de alta toxicidade [41], além do aumento do tempo de análise.

2.3.2.2 Cromatografia Gasosa

A GC é um método de separação de componentes de uma mistura, que consiste de duas fases, onde uma permanece estacionária durante todo o processo (pode ser um sólido ou um líquido disperso sobre um suporte) e a outra se move (gás) através desta. Assim a amostra é introduzida na coluna através de um injetor, onde o gás de arraste irá fluir e carregar a amostra, separando os componentes na coluna e estes terão sua presença acusada e quantificada em detector disposto no final da mesma [108].

O desenvolvimento de colunas capilares e detectores mais seletivos e sensíveis fizeram da GC uma técnica aplicada a uma grande extensão de compostos, inclusive com destaque na análise de fármacos. Se um composto tem suficiente volatilidade para ficar na fase gasosa abaixo de 400 °C e se ele não se decompõe a essa temperatura, o composto pode, provavelmente, ser analisado por GC [60].

Diversos fármacos não compatíveis com a GC podem ser derivatizados e analisados na rotina de trabalho [70]. No entanto, essa etapa de derivatização, que melhora as propriedades cromatográficas e a sensibilidade da detecção, introduz também uma etapa trabalhosa e longa na análise, além de poder introduzir erros devido às reações paralelas que podem ocorrer durante a derivatização [30, 70].

2.4.3. Quantificação

Na etapa de quantificação o analista estabelece a correlação entre o sinal do detector e quantidade do componente de interesse. Os sistemas para quantificação mais usados são: padronização externa; padronização interna e adição por padrão [109, 110].

A padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentração conhecida da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade de um composto conhecido chamado padrão interno [109]. Esta é recomendada quando alta precisão é necessária porque o padrão interno (PI) é submetido às mesmas condições da substância de interesse durante a corrida cromatográfica. O padrão interno deve ser escolhido dentro de alguns requisitos: o composto escolhido deve eluir da coluna adequadamente separado de todos os outros compostos da amostra, deve eluir o mais perto possível dos compostos de interesse, deve ser estável nas condições de análise e a quantidade injetada deve ser suficientemente estável para permitir a estocagem por um tempo adequado[110].

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com áreas obtidas com soluções de concentração conhecidas preparadas a partir de um padrão [109]. Os padrões são cromatografados separadamente em concentrações conhecidas para possibilitar o traçado de uma curva analítica que relacione a área com o peso do composto [110]. Para se obter uma melhor precisão deve-se manter as mesmas condições cromatográficas durante a análise, alternar os padrões com as amostras, manter o mesmo volume de injeção para os padrões e para a amostra, manter a concentração ou massa do padrão próxima à do componente de interesse e utilizar padrões de alta pureza [110]. A padronização externa é útil quando há uma pequena variação na composição de amostra ou quando as amostras testes são normalizadas antes da extração. Para análise de drogas de abuso em urina, particularmente em overdose, nas amostras nas quais a concentração do analito é muito alta, uma pequena quantidade de amostra pode ser diluída em diversos mililitros de uma solução tampão. Nesse caso a composição total da amostra é muito constante e assim os resultados obtidos por padronização externa fornecem resultados satisfatórios. No entanto, para matrizes complexas, como tecidos, a padronização externa é impraticável, a variabilidade na matriz da amostra causa imprecisão inaceitável nas análises [74].

Quanto ao método de adição por padrão, este pode ser dividido em adição do analito e adição. O método **adição do analito**, consiste em obter um número de alíquotas em replicatas de amostra, adicionar a elas quantidades crescentes e conhecidas do analito e diluir para o mesmo volume. Uma das alíquotas é diluída somente com o solvente, essa não contém o analito adicionado. Uma série de soluções obtidas desta forma serve como um conjunto de soluções de padronização. Quando a resposta de cada solução é plotada versus a concentração do analito adicionado, uma curva analítica é obtida relacionando as quantidades adicionadas da substância com a área obtida, esta intercepta o eixo das abcissas em valores maiores do que zero [111]. A extrapolação da reta dará o ponto zero e permitirá a medida, diretamente no gráfico, da concentração da substância de interesse na amostra [109].

O método de padronização por **adição** tem como base o método de adição do analito citado anteriormente, porém é feita uma única curva analítica por adição. Se uma série de amostras de composição idêntica é analisada, a curva analítica obtida por adição do analito pode ser deslocada em paralelo até a concentração zero e passar através da absorvância zero. Essa metodologia tem sido utilizada em pesquisas [112-113] quando se observa a mesma inclinação das retas de todas as amostras analisadas, indicando ausência de interferência de matriz. O ideal seria construir uma curva de padronização por adição do analito para cada amostra, porém o tempo e o gasto de material são altos. Assim, se torna mais adequado

construir uma única curva e utilizá-la para todas as amostras a serem analisadas. A técnica de padromização por adição é uma técnica de boa praticidade, pois pode ser desenvolvida em curto espaço de tempo e com pouco gasto de reagentes [111-113].

1.5 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura [114]. Em um sistema analítico, diversos fatores ou variáveis podem influenciar a resposta desejada. Portanto, deve-se selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema e estimar a sua influência no resultado do estudo [115]. Essa otimização de parâmetros experimentais é uma das etapas mais críticas do trabalho científico [116]. Diferentes técnicas podem ser utilizadas, entre elas a tradicional técnica univariada e, mais recentemente, a multivariada.

A técnica univariada é classificada como um método sequencial, no qual se fixam todos os fatores que estão sendo pesquisados em certo nível, exceto um deles que é variado até encontrar a melhor resposta. Na sequência este fator é fixado na melhor condição encontrada e um novo fator sofre variação. Esse processo se repete até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta. Este método apresenta como principal vantagem a fácil interpretação dos dados obtidos e é adequado para sistemas nos quais as variáveis otimizadas são independentes. No entanto, esse método envolve um número grande de experimentos e por negligenciar a interação entre as variáveis, o resultado obtido não necessariamente corresponde às condições que levam ao ótimo verdadeiro. Pois nos sistemas químicos as variáveis costumam-se correlacionar fortemente, interagindo através de mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e antagônicos [114, 116].

Procedimentos envolvendo a otimização multivariada vêm sendo muito utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos por serem mais econômicos e efetivos, além de permitir que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente [116]. Essa técnica tem como vantagens a melhor concordância entre os valores nominais e os valores pretendidos, com redução no número de ensaios, redução no custo operacional e do tempo gasto para obter as condições ótimas do método de extração [117]. Diversos modelos de planejamentos experimentais estão disponíveis e podem ser aplicados para a otimização multivariada em diferentes casos. Se for desejado detectar fatores afluentes, planejamentos experimentais com modelos de primeira ordem, como os modelos fatoriais e de Plackett-Burman, podem ser

usados. Por outro lado, para aproximar a função resposta ou para otimizar o processo, modelos de segunda ordem (superfície de resposta) devem ser usados [118].

Os sistemas de planejamento fatorial permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais [116]. Nestes, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto [115]. Um nível (O) pode ser também incluído no centro, no qual todas as variáveis estão no seu valor médio. Esses centros experimentais incluídos em planejamentos fatoriais possibilitam a identificação de relações não lineares no intervalo estudado e a estimativa do erro experimental, sem a necessidade de replicata de todo o planejamento [119]. O planejamento fatorial completo geralmente é aplicado em estudos preliminares e necessita de 2^k ensaios para sua execução, portanto, a cada fator adicionado ao estudo o número de ensaios que devem ser realizados é aumentado. Devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Os planejamentos fatoriais fracionários são usados com o objetivo de que com um número menor de experimentos possam-se obter informações sobre os efeitos mais importantes do sistema [114-115,118].

Quando é requerido um modelo mais sofisticado, como para a localização de um ponto ótimo das condições experimentais, deve-se recorrer a um modelo de segunda ordem, o qual empregam mais de dois níveis para permitir um ajuste de polinômio quadrático completo [118]. Assim para maximizar ou minimizar algum tipo de resposta a metodologia de superfície de resposta (MSR) é adequada [114].

A MSR é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G. E. P. Box nos anos cinqüenta. Estas superfícies representam uma boa maneira de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas oferecendo valiosas informações sob o comportamento das variáveis na região estudada. A MSR é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento, que devem ser repetidas tantas vezes quanto forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície estudada [114].

Neste trabalho, serão apresentados os planejamentos Composto Central (CCD: Central Composite Design) e Doehlert, pois são planejamentos que proporcionam boas estimativas

para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos e fornecendo condições de avaliação dos coeficientes e do modelo [115].

O planejamento por matriz Doehlert (**Figura 05**) é um planejamento uniforme no qual seus pontos experimentais são igualmente espaçados em círculos, esferas ou hiperesferas concêntricas (um hexágono no caso de duas variáveis). O planejamento Doehlert tem uma estrutura propícia para a aplicação da MSR, permitindo a estimativa dos parâmetros do modelo quadrático e a construção de planejamentos sequenciais. Esta última propriedade, devido a sua grande mobilidade pelo domínio experimental. A extensão do domínio experimental é explorado com um número de ensaios N . Sendo assim, k fatores ($2 \leq k \leq 10$) necessitam de $k^2 + K + 1$ experimentos e um mínimo de três níveis é assegurado para cada fator. Para um planejamento de duas variáveis, as dimensões da matriz de Doehlert são 5 e 3 [120].

O planejamento Doehlert mostra-se adequado e vantajoso por vários motivos: (a) ele é facilmente aplicado às variáveis experimentais e necessita de poucos experimentos; (b) permite a construção de planejamentos sequenciais em direção na qual a resposta máxima é esperada, e (c) a quantidade de níveis relacionados a cada fator pode ser selecionada de forma a obterem maiores informações sobre os fatores mais significantes ou problemáticos [120].

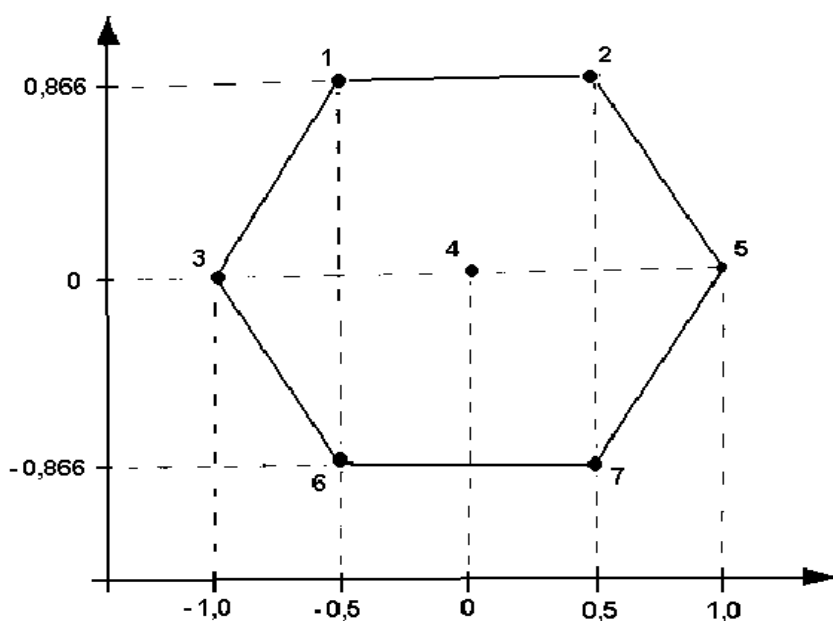


Figura 05: Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular.

Os planejamentos compostos centrais (CCD) foram apresentados como uma evolução dos planejamentos 3^3 , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários [115]. O CCD possui características interessantes para a busca do ponto que forneça a resposta ótima. Estas características são um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos, o fato de poderem ser realizados sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema, isto é, através da execução de uma parte dos experimentos (aplicando experimentos fatoriais 2^k ou fração-experimento de primeira ordem) através da técnica do caminhar ascendente ótimo. Isso consiste em chegar à região que contém o ótimo e, então, comparar a parte do delineamento, que consiste dos pontos axiais, com o objetivo de avaliar a parte curvilínea aí existente, de forma a chegar à solução ótima, que maximiza os resultados do sistema [121].

O planejamento composto central é na verdade o planejamento fatorial clássico em dois níveis (2^k), utilizado para ajuste em equação de primeira ordem, acrescida de alguns pontos experimentais que permitem estimar os coeficientes de uma superfície de 2ª ordem. O planejamento em estrela é um exemplo de planejamento composto central para dois fatores (Figura 06).

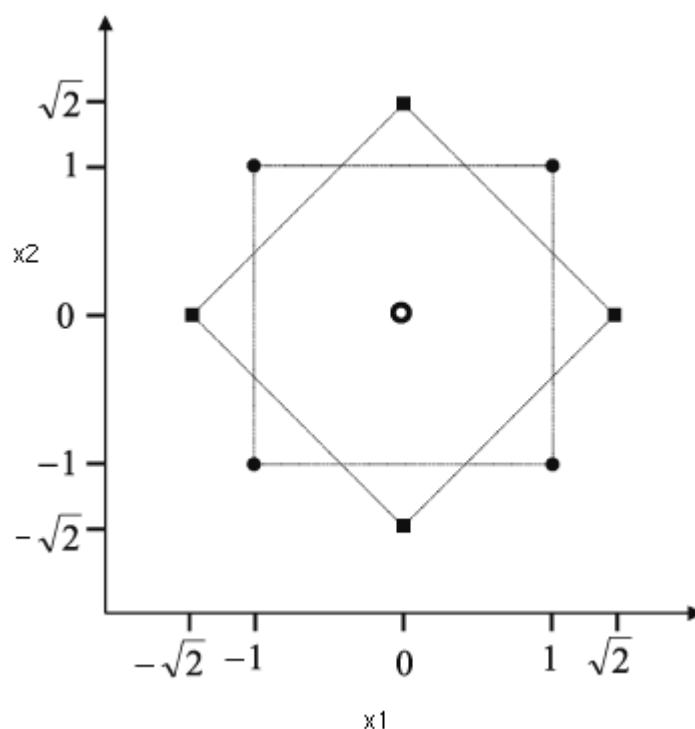


Figura 06: Planejamento em estrela para duas variáveis, onde x_1 e x_2 representam os valores das variáveis estudadas [114].

1.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método for modificado para atender aos requisitos específicos ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas [108, 122, 123].

Para iniciar estudos sobre a elaboração de uma metodologia ou mesmo buscar confiabilidade na metodologia existente é necessário definir as ferramentas e as medidas a serem utilizadas (**Tabela 05**). A validação deve ser o mais abrangente possível, incluindo estrutura, higiene e segurança [108].

Os parâmetros a serem validados variam entre as áreas, por exemplo, os requisitos para a validação de metodologia analítica para a área de saúde e agricultura diferem em vários aspectos [122]. Os parâmetros básicos de desempenho do método a serem aplicadas são: seletividade; faixa de trabalho; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão; robustez e incerteza da medição [108, 122-124].

Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado **específico**, já um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta entre vários analitos é chamado **seletivo** [123]. Na seletividade a espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferentes que possam levar à confusão na identificação ou dar margens de não confiabilidade ao resultado quantitativo [108].

Diversos parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas para descrever a **especificidade** do método, entre eles: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de retenção e fator de assimetria [123]. Especificidade significa que o valor medido provém somente do analito, onde pode se assegurar que não há interferentes [108].

O **limite de detecção** (LOD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, dentro de um nível de confiança especificado ou que pode ser especificamente diferente do ruído. O limite de detecção *do equipamento* é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. Limite de detecção *do método* é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero [123].

Tabela 05: Ferramentas e medidas utilizadas na validação de métodos analíticos [108].

FERRAMENTA ANALÍTICA	OPÇÕES
Média	Moda; mediana; média aritmética
Números de algarismos significativos	Número de decimais que acompanharão os valores da unidade de medida
Erro	Erro em relação ao extremo da medidas; erro em relação a média aritmética; erro em relação ao valor verdadeiro
Desvios	Variância; desvio padrão; estimativa da variância; estimativa do desvio padrão; coeficiente da variação
Repetibilidade	Máxima diferença aceitável entre duas repetições, do mesmo laboratório, sob as mesmas condições.
Reprodutibilidade	Máxima diferença aceitável entre dois resultados individuais
Número de medidas para o método	Convenção; usando repetibilidade ou reprodutibilidade; aplicando taxa de risco
Número de medidas no dia a dia analítico	Amplitude; convenção; determinados, baseados no valor t de student.
Rejeição de resultados	Utilizar da rejeição; teste Q; teste g
Seletividade	Sinal analítico isento de interferências; comprovação; conhecendo os componentes da formulação; utilizando recursos instrumentais ou técnicas analíticas de identificação
Padrões	Sistema de organização para armazenar e manipular o padrão; padrão reagente analítico; padrão histórico; rastreável
Recuperação	Por operação unitária; por operação global; como expressar o resultado com fator de recuperação
Ensaio interlaboratorial	Externo
Linearidade	Cálculos a partir de curvas de resposta; coeficiente de correlação; regressão linear; n° de pontos na curva
Calibração / ajuste	Intervalo de tempo; testes de verificação da calibração; ajuste interno ou externo
Como amostrar	Probabilística ; não probabilística; diferenciada
Ensaio do resultado	Expressão da variabilidade; relatório técnico; boletim comum; laudo; espécie de cálculo quantitativo; expressão das unidades

O **limite de quantificação ou determinação (LOQ)** é o menor valor do analito determinado, em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Para o limite de determinação considera-se que não atingiu o limite da técnica/método ou do equipamento [108].

A partir dos termos precisão e exatidão surgem os diversos termos muito utilizados na cromatografia e constituem processos normalmente utilizados para avaliar um método. São valores de precisão: repetibilidade, reprodutibilidade, desvios e testes de rejeição. São valores de exatidão: seletividade, curva de resposta, calibração, padrões, linearidade e recuperação [108, 123].

Denomina-se **precisão** à concordância entre os vários valores experimentais obtidos, quanto mais próximos entre si estiverem (menor amplitude), ou seja, maior será a precisão quanto menor for a amplitude das medidas [108]. Normalmente é expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) [123]. Essas declarações de precisão se referem à análise quantitativa, onde a precisão não pode ser expressa como um RSD ou CV, mas deve ser expressa como taxas de verdadeiro, falso positivo e negativo. Essas taxas devem ser determinadas numa variedade de concentrações abaixo do nível limite, no nível limite e acima deste. Comparação com outro método deve ser realizada, se um método apropriado estiver disponível [124].

A **repetibilidade** (precisão intracorrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. **Precisão intermediária** (precisão intercorrída): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A **reprodutibilidade** (precisão interlaboratorial) é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica [125].

A **exatidão** de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre a média obtida e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança [108, 125]. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, com três replicatas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a

concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente [125].

Para análise quantitativa, a **faixa de trabalho** de um método é determinada pelo exame de amostras com diferentes concentrações de analito e determinação da faixa de concentrações, para qual a incerteza admissível possa ser encontrada [124].

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados (sinal analítico) que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. Os resultados obtidos são usados para obter uma reta por regressão com relação ao cálculo de analito, usando o método de mínimos quadrados. Para o estudo da linearidade faz-se necessário à obtenção de uma curva resposta sendo o eixo **x**, a concentração e o eixo **Y** a resposta obtida: $y = ax + b$, onde **a** é o coeficiente angular e **b** o coeficiente linear [108, 122-124].

A faixa linear e a faixa de trabalho podem ser diferentes para cada tipo de amostra devido ao efeito das interferências provenientes da matriz.

A **sensibilidade** depende de quanto o método é capaz de discriminar entre amostras de teores muito semelhantes; é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva analítica. Esta depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada. A sensibilidade é definida como: $S = \Delta x (\text{variação da resposta}) / \Delta c (\text{variação da concentração})$ [108, 123].

Outros parâmetros importantes também estão sendo usados para a validação: robustez; conformidade do sistema (system suitability) e a validação do instrumento [108, 126-127].

A **robustez** é a medida da capacidade do método em não ser afetado por pequenas, porém deliberadas variações nos parâmetros do método. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado [108, 125, 127].

A **conformidade do sistema** é usada para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico é adequada para análise a ser realizada [127].

A **validação do instrumento** possibilita certificar que o equipamento e o software estão calibrados e em conformidade com parâmetros definidos pelo fabricante [108]. O termo calibração tem como definição um conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões [128].

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar fármacos em urina enfatizando o método de quantificação e também determinar fármacos em água através das técnicas de SPE e SPME ressaltando o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar o método de padronização por adição para quantificar paracetamol e hidroclorotiazida em urina humana por HPLC e comparar com os resultados obtidos pelas técnicas convencionais de padronização.
- Otimizar univariadamente a metodologia para determinação de fármacos (paracetamol, ácido acetil salicílico, diclofenaco e carbamazepina) em água, utilizando a técnica de preparo da amostra SPE e determinação por HPLC.
- Validar o método para determinação de fármacos em água por SPE e HPLC.
- Desenvolver e otimizar metodologia analítica para determinação de fármacos em água através da técnica de SPME e determinação por GC, visando a extração de fármacos com características ácidas (ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco) e básicas (diazepam e loratadina) simultaneamente (em uma única extração).
- Aplicar as ferramentas multivariadas: planejamento fatorial completo e metodologia de superfícies de resposta de acordo com a matriz Doehlert e planejamento composto central para otimização da metodologia de SPME.
- Validar a metodologia analítica desenvolvida em água por SPME e GC.

CAPÍTULO 3

*Determinação de paracetamol e hidroclorotiazida em
urina humana por HPLC: uso da técnica de
padronização por adição.*

3.1 INTRODUÇÃO

O analgésico paracetamol e o diurético tiazídico hidroclorotiazida constituem duas importantes classes farmacêuticas extensivamente recomendadas por profissionais da saúde e amplamente consumidos pela automedicação. Vários são os métodos analíticos reportados para determinação desses dois fármacos, individualmente ou em combinação com outras drogas, como também de seus principais metabólitos. Tais métodos foram desenvolvidos para análise em matrizes simples como formulação farmacêutica (comprimidos, cápsulas, soluções) até matrizes mais complexas como os fluídos biológicos. Para paracetamol os métodos mais utilizados são: calorimetria, espectrofotometria, cromatografia em camada delgada, gasosa e líquida [129-131] e para hidroclorotiazida: voltametria, eletroforese capilar, espectrometria e cromatografia gasosa e líquida [132-140]. Recentemente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando detector ultravioleta (UV) ou eletroquímico tem sido uma das técnicas preferidas devido ao aumento da seletividade e detectabilidade das análises.

A calibração em química analítica é uma operação importante que determina a relação funcional entre os valores medidos e as grandezas analíticas, caracterizando os tipos de analitos e suas quantidades ou concentrações [141]. Para a quantificação o analista estabelece a correlação entre o sinal do detector e a quantidade do componente de interesse. Os sistemas para quantificação mais usados são: normalização; padronização externa; padronização interna e adição por padrão [110].

Os métodos de quantificação por padronização externa e adição por padrão foram utilizados nesse trabalho. Para a padronização externa interessa apenas um composto ou poucos compostos. Os padrões são cromatografados separadamente em quantidades conhecidas para possibilitar o traçado de uma curva analítica que relacione a área com a concentração do composto [110]. Quanto ao método de adição por padrão, este pode ser dividido em adição do analito e adição. No método adição do analito, quantidades crescentes e conhecidas do composto de interesse são adicionadas a quantidades conhecidas da amostra e cromatografadas. As quantidades das amostras devem ser sempre as mesmas. Uma curva analítica é construída. A extrapolação da reta dará o ponto zero e permitirá a medida, diretamente no gráfico, da concentração da substância de interesse na amostra. A padronização por adição tem como base o mesmo procedimento inicial da adição do analito. São adicionadas as alíquotas da amostra quantidades gradativas do analito, sendo que uma alíquota contém zero de analito adicionado. Após plotagem é obtida uma curva analítica que

intercepta o eixo do sinal analítico em valores maiores do que zero. A subtração da concentração do analito é realizada extrapolando a curva analítica para interceptar o eixo da concentração negativa, onde a equação da reta obtida pode ser utilizada em seguida para as leituras das demais amostras. Esta metodologia pode ser utilizada quando se observa a mesma inclinação das retas de todas as amostras analisadas, indicando ausência de interferência de matriz [111-113].

Assim, após estabelecer uma metodologia para a determinação de paracetamol e hidroclorotiazida em urina humana através de cromatografia líquida de alta eficiência, foi feita a comparação de três métodos de quantificação: padronização externa, padronização por adição do analito e padronização por adição, assim como verificar a possibilidade de uso de uma única curva analítica por adição para determinar a concentração de um grupo de amostras, buscando assim reduzir os custos das análises.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados no preparo das soluções e preparo da fase móvel foram:

- Metanol, grau HPLC, Merck;
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck;
- Fosfato monobásico de sódio, grau P.A., Vetec;
- Água ultrapura (18,2 MΩcm) obtida de um sistema Milli-Q de purificação (Millipore® -Bedford, MA, USA).

3.2.1.2 Padrões

As substâncias químicas de referência da Farmacopéia Brasileira (paracetamol e hidroclorotiazida) foram adquiridas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Saúde - Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ / INCQS).

3.2.1.3 Colunas cromatográficas

Para análise de paracetamol e hidroclorotiazida foram utilizadas duas colunas cromatográficas:

- Coluna MICROSORB-MV 100 C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm de diâmetro);
- Coluna CHROMPACK inertesil -ODS C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm de diâmetro); coluna de guarda CHROMPACK inertesil -ODS C18.

3.2.1.4 Membranas de filtração

Para amostras e solventes foram usadas: membranas de nylon (Advantec mts, Inc) e de acetato de celulose (Schleicher & Schuell) com diâmetro de 13 e 47 mm e poro de 0,45 µm.

3.2.1.5 Equipamentos

- Banho ultrassônico UNIQUE, mod USC-2800A;
- Balança analítica OHAUS EXPLORER, mod E12140;
- Bomba a vácuo PRISMATEC, mod 131;
- Agitador de tubos MARCONI, mod MA162;
- Cromatógrafo líquido *Varian*, composto por:
 - Bomba PROSTAR 210/215 (2 unidades);
 - Detector: UV/VIS PROSTAR 320;
 - Auto amostrador: PROSTAR 410, capacidade para 84 tubos, alça de amostragem de 100 µl;
 - Degaseificador, Metachem Technologies Inc;
 - Software Star Chromatography Workstation, versão 5.0;

3.2.2 Método

Os dois fármacos investigados, paracetamol e HCT, foram analisados e quantificados separadamente.

3.2.2.1 Coleta das amostras

Primeiramente foram coletadas 10 amostras (30 mL) de urina de indivíduos voluntários, no intervalo de 1 a 8 horas, após a ingestão de comprimidos de PARACETAMOL (750 mg) e realizado a quantificação das amostras. Em seguida foram coletadas 10 amostras (30 mL) de urina, no intervalo de 3 a 9 horas, após a ingestão de comprimidos de HCT (50 mg). Quando não utilizadas no dia da coleta, as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento da análise.

3.2.2.2 Preparo das soluções padrão

A solução estoque na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o fármaco paracetamol foi preparada utilizando a mistura água: metanol (75:25) como solvente. Para o fármaco HCT a solução estoque foi preparada na concentração de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na mistura de solvente metanol: água (70:30).

3.2.2.3 Estudo das condições cromatográficas

As condições cromatográficas para paracetamol e hidroclorotiazida estão apresentadas na **Tabela 06** e foram baseadas no trabalho de Vertzoni *et al.*, 2003 [129] e de Farthing *et al.*, 1998 [137] para paracetamol e hidroclorotiazida, respectivamente.

Tabela 06: Condições cromatográficas utilizadas para o estudo das técnicas de calibração.

Analito	Parâmetros	Paracetamol	Hidroclorotiazida
<i>Fase móvel</i>		água/metanol (85:15 v/v);	fosfato monobásico de sódio 0,1 mol L ⁻¹ / acetonitrila (84.5: 14.5 v/v) pH = 3,0
<i>Coluna cromatográfica</i>		MICROSORB-MV 100 C18;	CHROMPACK inertesil -ODS C18; (4,6 x 250 mm, 5 μm de diâmetro)
<i>Vazão</i>		1,2 mL min ⁻¹	2 mL min ⁻¹
<i>Comprimento de onda</i>		243 nm	254 nm
<i>Vol. de injeção</i>		10 μL	10 μL

3.2.2.4 Metodologia analítica

- Determinação de paracetamol

As amostras de urina foram preparadas adicionando 200 μL de urina e 1800 μL de água milli-Q em tubo de vidro, e agitadas em vortex por 10 s. A urina diluída foi filtrada e uma porção de 10 μL foi injetada no HPLC [104].

- **Determinação de hidroclorotiazida**

As amostras de urina foram preparadas pipetando 400 μL de urina e 1800 μL de água milli-Q em um tubo de vidro, sendo agitadas em vortex por 10 s. A urina diluída foi filtrada e uma porção de 10 μL foi injetada no HPLC [105].

3.2.2.5 Estudo dos métodos de quantificação

Para construção da curva analítica, obtenção da linearidade, LOD e LOQ do instrumento foram utilizadas soluções padrão preparadas em água: metanol (75:25 v/v) e metanol: água (70:30 v/v) para paracetamol e HCT, respectivamente.

Padronização externa

A construção da curva analítica por padronização externa consistiu das seguintes etapas:

- Foram preparadas concentrações crescentes dos fármacos estudados utilizando como solvente urina diluída e filtrada isenta dos fármacos paracetamol e HCT.
- Soluções foram cromatografadas.
- Construiu-se um gráfico sinal/concentração e obteve-se a equação de reta.
- Esta equação de reta foi utilizada para os cálculos das concentrações das amostras.

Adição do analito

Para construção da curva analítica por adição do analito as etapas foram:

- Preparação das soluções com concentrações crescentes dos fármacos estudados em amostras reais de urina (solvente) que apresentava um dos dois analitos investigados. As amostras foram divididas em alíquotas e adicionado volumes crescentes da solução padrão, ficando uma das alíquotas sem a adição do analito.
- Soluções foram cromatografadas.
- Construiu-se um gráfico sinal/concentração e obteve-se a equação de reta.

- A concentração do analito em cada amostra foi calculada com a sua respectiva equação da reta. Assim, foi construída uma curva analítica para cada amostra investigada.

Padronização por adição: Técnica proposta

Para construção da curva analítica por adição as etapas foram:

- Preparação das soluções com concentrações crescentes dos fármacos estudados em amostra real de urina (solvente) com os dois analitos investigados. As amostras foram divididas em alíquotas (1 mL) e adicionado volumes crescentes da solução padrão, ficando uma das alíquotas sem a adição do analito.
- Soluções foram cromatografadas.
- Construiu-se um gráfico sinal/concentração e obteve-se a equação de reta para cada amostra.
- Após a obtenção das curvas individuais médias para todas as amostras, estas foram plotadas em um único gráfico para comparar o perfil das curvas e verificar a possibilidade de aplicação da técnica de calibração por adição.
- Se estas equações apresentam retas com a mesma inclinação, caracterizam semelhança de matriz, e pode ser aplicada a calibração por adição.
- Comparação dos valores do coeficiente angular “B”, e seleção de um valor B médio.
- Selecionou-se então a reta que apresentava a inclinação mais próxima desse valor médio.
- Com a equação da reta escolhida foi calculada a concentração da amostra que não foi adicionado padrão e em seguida foi acrescentado esse valor ao valor considerado para as demais amostras,
- Obteve-se uma nova relação concentração/área.
- Obtenção de uma nova reta, que foi definida como reta padrão e foi utilizada para o cálculo de todas as amostras.

A solução utilizada como solvente e as concentrações utilizadas para o cálculo da linearidade do equipamento e obtenção das curvas analíticas dos diferentes métodos de quantificação estão relacionadas na **Tabela 07**.

Tabela 07: Condições analíticas para construção das curvas analíticas para padrão externo e adição do analito.

Princípio ativo	Parâmetros	Linearidade	Padrão Externo	Adição do analito
Paracetamol	Solvente	água : metanol (70:30 v/v)	Urina isenta	Urina fortificada ^a
	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,024; 0,048; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 10 e 24	0,3; 0,6; 0,9 e 24	0 ^b ; 0,5; 0,9; 24 e 50
Hidroclorotiazida	Solvente	metanol: água (70:30 v/v)	Urina isenta	Urina fortificada
	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,06; 0,18; 0,75; 1,5; 3; 4,5; 9; 12 e 24	0,6; 1,77; 2,93; 9,4; 20,8; 43,6 e 63,77	0 ^b ; 2,93; 9,4; 20,8; 43,6 e 63,77 ^c 0 ^b ; 0,3; 0,6; 2,93; 9,4; 20,8 e 43,6 ^d

^a fortificada com a substância estudada; ^b amostra que não foi adicionado padrão; ^c concentrações utilizadas para as primeiras 5 amostras HCT; ^d concentrações usadas para as 5 últimas amostras de HCT.

3.2.2.6 Testes estatísticos

Para avaliar as diferenças estatísticas dos resultados obtidos entre as três técnicas de padronização foram utilizados o teste t-student, teste ANOVA e o teste de análise de variância.

3.2.2.7 Validação de metodologia

A especificidade do método foi verificada através da injeção de amostras de urina (branco), sem os analitos estudados.

A linearidade da metodologia foi verificada conforme já explicado no item 3.2.2.5. Os valores de LOD e LOQ foram calculados segundo os parâmetros obtidos da curva analítica, sendo expressos como $LOD = 3,3 \times s/b$ e $LOQ = 10 \times s/b$, onde: s é o desvio-padrão do coeficiente linear da curva analítica obtida e b é a inclinação da reta ou coeficiente angular da curva analítica. A precisão foi verificada através do cálculo do RSD na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o paracetamol e $2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para hidroclorotiazida. A exatidão foi realizada em triplicata nas concentrações de $9,4$ e $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o fármaco paracetamol e hidroclorotiazida. Os cálculos para a validação foram efetuados utilizando os softwares Microsoft Excel® e Microcal Origin®.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para atingir o objetivo deste trabalho foram realizadas três etapas: na primeira etapa foi necessária a escolha de um procedimento cromatográfico simples para determinar paracetamol e HCT, separadamente. Para a escolha do procedimento, este não deve conter etapas tediosas tais como extrações e procedimentos de limpeza, mas deve permitir que se obtenha resultados de eficiência, seletivos e sensíveis para analito alvo. Na segunda etapa, três diferentes métodos de padronização foram usados para determinar a concentração da paracetamol e HCT em amostras de urina. Na última etapa, foi investigado se havia diferenças significativas entre os três métodos de padronização usados para determinar a concentração dos compostos em estudo.

3.3.1 Parâmetros analíticos

Os métodos adaptados para determinar paracetamol e HCT foram avaliados quanto à linearidade, ao limite da detecção e quantificação, a precisão, a exatidão e a especificidade. A **Tabela 08** apresenta as informações sobre estes parâmetros quando usada à fase móvel ou urina livre do fármaco como o solvente na preparação das soluções de trabalho. A área dos picos, obtida para paracetamol e HCT, na calibração padrão foi proporcional a sua concentração na urina livre do fármaco na extensão de $0,3 - 24 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,6 - 63 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas foram ajustadas pela regressão linear dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação foram maiores de 0,9995.

Para o cálculo das concentrações do fármaco paracetamol nas amostras estudadas foram utilizadas para a padronização externa a equação da reta $y = 22125x + 1232$ ($R = 0,9999$), para a padronização por adição a equação $y = 23142x + 99,92$ ($R = 0,9977$), e para adição do analito foram utilizadas curvas individuais para o cálculo de cada amostra. Para o composto HCT as equações utilizadas foram $y = 16812x + 2845$ ($R = 0,9997$) para padronização externa, $y = 16579x + 99,74$ ($R = 0,9997$) e $y = 16621x + 262,1$ ($R = 0,9995$) para padronização por adição e equações individuais para a padronização por adição do analito.

Tabela 08: Parâmetros analíticos obtidos para os fármacos paracetamol (AC) e hidroclorotiazida (HCT).

Composto	Matriz	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	R (n) ^c
AC	Fase móvel	0,02- 24	0,07	0,23	$y = 21326x + 146,66$	0,9998(8)
	urina isenta	0,3-24	0,17	0,56	$y = 22124,7x + 1232$	0,9999(4)
HCT	Fase móvel	0,06-24	0,17	0,55	$y = 29210x + 361,94$	0,9995(9)
	urina isenta	0,6-63,7	0,75	2,5	$y = 16812x + 2845$	0,9997(7)

^a LOD limite de detecção; ^b LOQ limite de quantificação; ^c R coeficiente de correlação; n número de pontos em cada curva.

A separação cromatográfica encontrada para determinar paracetamol e HCT mostrou bons resultados no procedimento de fortificação, mesmo não incluindo etapa de limpeza. A especificidade, em relação a outros componentes na urina, pode ser observada na **Figura 07** para paracetamol e **Figura 08** para HCT. Para a precisão, expressa como estimativa do desvio padrão relativo, foi encontrado valores de 1,2 % para paracetamol e 1,5 % para HCT. A exatidão do método foi obtida pela fortificação de amostras com os compostos estudados e determinado a sua recuperação. Os valores encontrados estavam entre 94-101% para ambos os analitos.

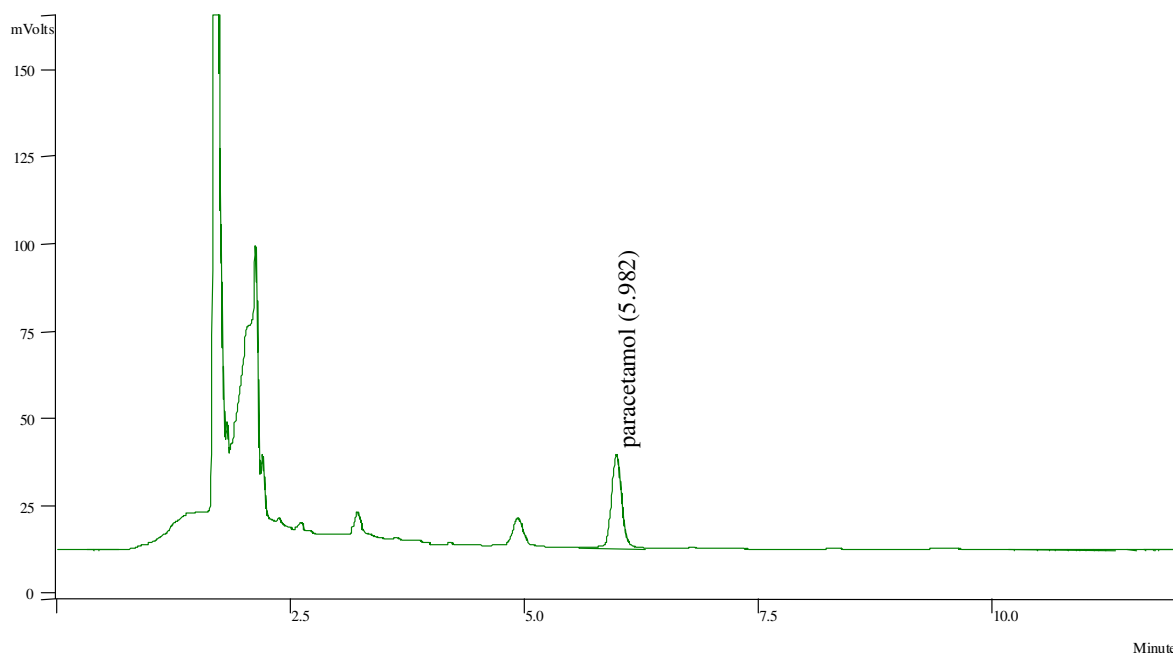


Figura 07: Cromatograma obtido para o fármaco paracetamol ($2,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) em urina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica MICROSORB-MV 100 C18; fase móvel, água/metanol (85:15 v/v); fluxo $1,2 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda 243 nm.

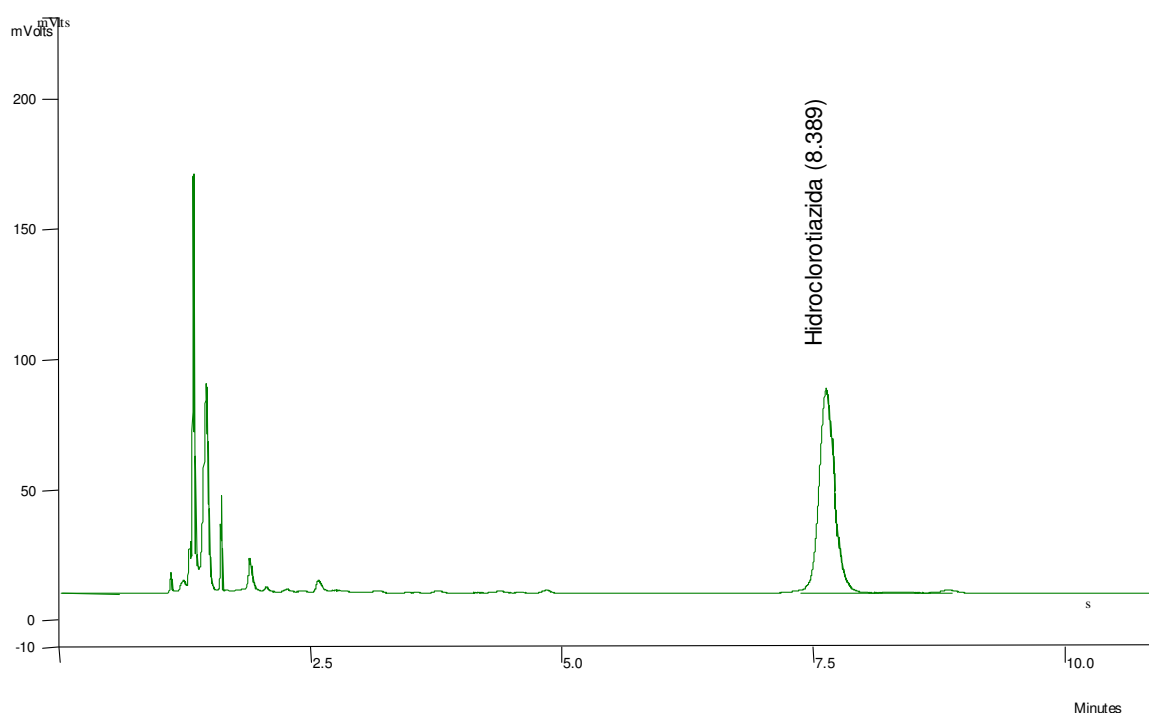


Figura 08: Cromatograma obtido para o fármaco HCT ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em urina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica, CHROMPACK Inertesil – ODS C18; fase móvel, fosfato monobásico de sódio 0,1 M/acetonitrila (84,5:14,5 v/v) pH 3,0; fluxo 2 mL min^{-1} ; comprimento de onda 254 nm.

3.3.2 Comparação dos procedimentos de padronização.

A sequência desse estudo foi baseada na comparação da concentração dos dois fármacos em amostras de urina obtida pela padronização externa usando urina livre do fármaco, padronização por adição do analito e padronização por adição.

Para ambos os estudos (paracetamol e HCT) os ângulos obtidos para as curvas analíticas das amostras de urina pelo método de adição do analito foram muito próximos, o que indica a presença de matrizes similares. A similaridade entre as matrizes indica que as amostras contêm as mesmas interferências que agem da mesma maneira no analito alvo.

Apenas uma curva analítica por adição do analito foi escolhida para gerar a curva analítica por adição para paracetamol e outra para HCT. Neste estudo, para ambos os analitos, a curva analítica por adição do analito escolhida era a mais próxima ao coeficiente angular médio calculado pelas curvas de adição padrão. Para gerar a nova curva (padronização por adição) o valor da concentração de paracetamol ou HCT (determinada previamente na amostra de urina usando a curva por adição de analito) foi adicionado à quantidade original de paracetamol ou HCT através da solução via solução estoque, e o sinal foi o mesmo obtido da curva por adição de padrão, gerando uma nova curva analítica (padronização por adição). Esta nova curva foi usada para obter a concentração de paracetamol ou HCT nas dez amostras de urina e usada também para fazer comparações entre as técnicas de padronização por adição e adição de analito.

Os resultados para a concentração de paracetamol e HCT nas amostras de urina, expressados como média e estimativa de desvio padrão, referentes às técnicas de padronização estão mostradas nas **Tabelas 09 e 10**, respectivamente. A técnica de padronização proposta forneceu bons resultados em relação às técnicas convencionais e não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre as concentrações de paracetamol ou HCT depois da aplicação do teste t-Student pareado *two-tailed*. O teste ANOVA foi também aplicado em cada grupo de amostras de urina. O valor F foi computado e comparado ao valor padrão tabelado usando um nível de significância de $p = 0,05$. Da tabela padrão, para $n_1 = 2$ e $n_g = 27$ ($p = 0.005$), o valor de F é dado como 3,35. Os valores F calculados não excederam os valores tabelados de F na análise de variância, indicando que não havia nenhuma diferença significativa entre os métodos de padronização. Os resultados de ANOVA estão mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 09: Estudo comparativo entre as três técnicas de padronização para determinação de paracetamol em urina.

Amostras	Padronização					
	Externa		Adição		Adição do analito	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	+/- s	$\mu\text{g mL}^{-1}$	+/- s	$\mu\text{g mL}^{-1}$	+/- s
Am 1	0,9	0,05	1,0	0,05	0,8	0,3
Am 2	1,5	0,09	1,4	0,09	1,1	0,3
Am 3	2,8	0,1	2,7	0,1	2,4	0,03
Am 4	13,3	0,5	13,4	0,5	13,0	0,5
Am 5	5,8	0,1	5,8	0,1	6,2	0,6
Am 6	2,6	0,04	2,6	0,04	2,4	0,1
Am 7	7,6	0,5	7,6	0,04	8,2	0,7
Am 8	1,6	0,1	1,6	0,2	1,4	0,3
Am 9	2,6	0,3	2,6	0,3	2,1	0,2
Am 10	14,7	0,4	14,9	0,4	14,9	0,4

Tabela 10: Estudo comparativo entre as três técnicas de padronização para determinação de HCT em urina

Amostras	Padronização					
	Externa		Adição		Adição do analito	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\pm s$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\pm s$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\pm s$
1	1,2	0,06	1,4	0,06	1,8	0,1
2	2,0	0,05	2,2	0,05	2,3	0,05
3	1,8	0,03	2,0	0,03	2,1	0,2
4	5,0	0,05	5,2	0,05	6,0	0,007
5	3,2	0,1	3,4	0,1	4,1	0,2
6	4,5	0,1	4,9	0,1	4,7	0,1
7	2,3	0,001	2,5	0,001	2,3	0,08
8	2,4	0,05	2,6	0,009	2,6	0,03
9	2,9	0,04	3,0	0,1	2,8	0,02
10	14,5	0,1	14,8	0,1	14,9	0,1

Tabela 11: Resultados obtidos para o teste ANOVA para os fármacos paracetamol e HCT em amostras de urina usando três métodos quantitativos.

Fonte da variação	Soma dos quadrados		Graus de liberdade		Quadrados médios		F-test (p = 0,05) F* = 3,35	
	AC ¹	HCT ²	AC	HCT	AC	HCT	AC	HCT
Entre								
grupos	0,4368	0,780	2	2	0,2184	0,390	0,0081	0,0255
Dentro dos								
grupos	722,97	413,45	27	27	26,776	15,313		
Total	723,41	414,23	29	29				

Devido à larga escala da concentração de paracetamol e HCT em amostras de urina, foi possível comparar os resultados obtidos pela técnica da adição e pelas técnicas convencionais pela regressão linear para grupo inteiro de valores. Os resultados destas comparações são mostrados na **Figura 09** (A e B para Paracetamol; C e D pra HCT) e em seus valores correspondentes para o coeficiente de correlação, ângulo e valores de intercepto são apresentados na **Tabela 12**. O valor da inclinação é muito perto do valor teórico da unidade e o valor do intercepto não difere significativamente de zero para todas as comparações que não indicam nenhuma diferença entre a concentração de paracetamol ou HCT obtida pelas técnicas de quantificação. Neste sentido, é possível gerar apenas uma curva usando a matriz da amostra para quantificar as outras amostras. Neste trabalho, foi possível gerar uma curva analítica para obter a concentração de paracetamol de 10 amostras. O mesmo procedimento, isto é, gera apenas uma curva analítica para HCT na matriz urina e esta é usada para obter a concentração de HCT em 10 amostras.

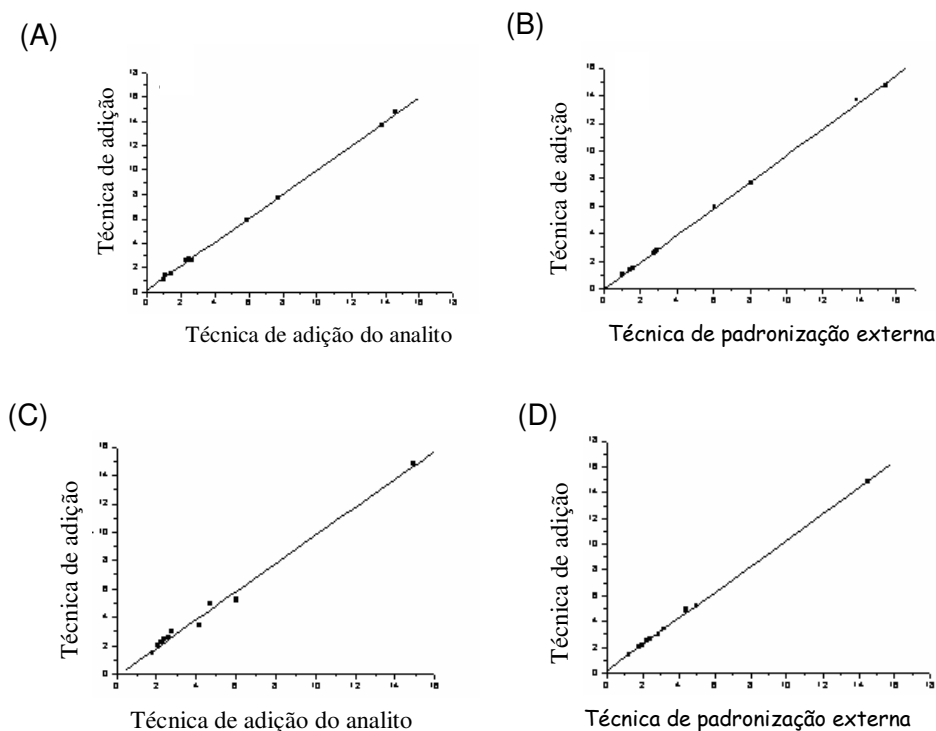


Figura 09: Regressão linear do presente método de padronização: versus (A) adição do analito, versus (B) Padronização externa de paracetamol, versus (c) Padronização por adição do analito, versus (D) padronização externa de HCT, em 10 amostras de cada analito contaminada.

Tabela 12: Parâmetros de relevância estatística para a regressão linear entre os resultados obtidos para as técnicas de padronização em amostras naturalmente contaminadas.

Concentração	Nº de pontos	Coef. de correlação	Ângulo, $b \pm tSb^a$	Intercepto, $a \pm tSa^b$
AC				
	Adição vs	Adição do Analito	calibração	
1,0-13,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10	0,996	$0,99 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,07$
	Adição vs	Externa	calibração	
1,0-13,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10	0,999	$0,97 \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,00$
HCT				
	Adição vs	Adição do Analito	calibração	
1,2- 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10	0,996	$0,99 \pm 0,03$	$-0,13 \pm 0,18$
	Adição vs	Externa	calibração	
1,2- 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10	0,999	$1,01 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,04$

^a Desvio padrão do coeficiente angular; ^b Desvio padrão do coeficiente linear

3.4. CONCLUSÃO PARCIAL

Analisando os resultados obtidos, para paracetamol e hidroclorotiazida, conclui-se que o método por adição pode ser utilizado para determinação desses fármacos em urina por cromatográfica líquida de alta eficiência. A padronização por adição provou ser de confiança, para amostras fortificadas e naturalmente contaminadas, em uma larga escala de concentrações da droga, quando traçada de encontro às técnicas convencionais de padronização.

Também a concentração de paracetamol e HCT obtida pela padronização por adição não apresentou diferenças de outras técnicas de padronização quando avaliados estatisticamente com os testes *t*-Student, ANOVA e análise de variância.

A técnica de padronização proposta requer poucos reagentes e menos material que a padronização por adição de analito, sendo também simples e menos consumidora de tempo.

CAPÍTULO 4

Otimização de parâmetros de pré-concentração para determinação de fármacos em água através de extração em fase sólida e cromatografia líquida.

4.1 INTRODUÇÃO

A constatação da presença de fármacos no meio aquático e seus possíveis impactos ambientais têm se tornado uma questão de grande importância, pelo fato destas serem moléculas extremamente ativas biologicamente, apresentar grande volume de produção e uso, e ter sua diversidade aumentada a cada ano. Essa poluição provocada por produtos farmacêuticos é um fenômeno complexo, pois se estima que cerca de 3000 diferentes compostos são usados como constituintes de produtos para medicina humana e veterinária, compreendendo uma grande extensão de moléculas de várias classes terapêuticas, com diferentes propriedades físico-químicas, estruturas químicas, ações ambientais e muitas vezes de natureza persistente [09, 10].

Pelo fato de muitos contaminantes estarem presentes no meio ambiente em concentrações baixas, para a sua determinação é exigido o uso de técnicas que possibilitem pré-concentrar os analitos presentes na matriz para adequação ao sistema de detecção [71]. Entre as técnicas de extração e pré-concentração de fármacos em água a extração em fase sólida (SPE) [07, 12, 14, 16, 21-23, 27, 36, 45, 69] se destaca devido às inúmeras aplicações, diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e mecanismos de separação. Estão disponíveis sorventes de variada natureza química e a escolha da fase sólida adequada deve considerar as características do analito e da matriz onde estes se encontram [78].

Visando a investigação de fármacos no meio ambiente e considerando o fato da etapa de extração e pré-concentração ser crítica e essencial na determinação dos mesmos em amostras ambientais, este capítulo teve como objetivo otimizar parâmetros de extração e pré-concentração para determinação de fármacos antiinflamatórios não-esteróides (paracetamol, AAS e diclofenaco) e do agente anti-epiléptico carbamazepina em água através de extração em fase sólida (SPE) com separação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV). A metodologia foi otimizada univariavelmente, submetida a testes de validação e após foi aplicada em amostras de água de rio e de efluente de estação de tratamento de esgoto.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Materiais

4.2.1.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados no preparo das soluções e preparo da fase móvel foram:

- Metanol, grau HPLC, Merck;
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck;
- Acetona, grau P.A., Vetec;
- Ácido fosfórico, grau P.A., Synth;
- Acetato de etila, grau P.A. Synth;
- Álcool etílico, grau P.A., Vetec;
- Ácido clorídrico, grau P.A. Vetec;
- Hidróxido de sódio, grau P. A., Synth;
- Água ultrapura (18.2 MΩcm) obtida de um sistema Milli-Q de purificação (Millipore® -Bedford, MA, USA).

4.2.1.2 Padrões

Foram utilizados como padrões substâncias químicas de referência da Farmacopéia Brasileira adquiridas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Saúde - Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ / INCQS). Os fármacos estudados nesse capítulo foram paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco.

4.2.1.3 Coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas utilizadas para análise e confirmação dos analitos foram:

- Coluna Pursuit – Varian C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm de diâmetro);
- Coluna Pursuit – Varian C8 (4,6 x 150 mm, 5 µm de diâmetro);

4.2.1.4 Cartuchos para SPE

Foram utilizados dois tipos de cartuchos de extração em fase sólida:

- Bond Elut C18, tamanho da partícula 50-150 μm , cartucho 3 mL (500 mg), Varian;
- Nexus polimérico (copolímero metacrilato de estireno-divinilbenzeno), tamanho da partícula 70 μm , cartucho 3 mL (60 mg), Varian.

4.2.1.5 Membranas de filtração

Para amostras e solventes foram usadas: membranas de nylon (Advantec mts, Inc) e de acetato de celulose (Schleicher & Schuell) com diâmetro de 13 e 47 mm e poro de 0,45 μm .

4.2.1.6 Equipamentos

- Banho ultrassônico UNIQUE, mod USC-2800A;
- Balança analítica OHAUS EXPLORER, mod E12140;
- Bomba a vácuo PRISMATEC, mod 131;
- pHmetro DIGIMED, mod DM21;
- Agitador de tubos MARCONI, mod MA162;
- Rotaevaporador, FISATON BRASIL, mod 557;
- Cromatógrafo a líquido **Varian**, composto por:
 - Bomba PROSTAR 210/215 (2 unidades);
 - Detector: UV/VIS PROSTAR 320;
 - Auto amostrador: PROSTAR 410, capacidade para 84 tubos, alça de amostragem 100 μl ;
 - Degaseificador, Metachem Technologies Inc;
 - Software Star Chromatography Workstation, versão 5.0;

4.2.2 Método

4.2.2.1 Coleta das amostras

Para a otimização foi utilizada como amostra água milli-Q fortificada com solução padrão.

Foram analisadas 10 amostras ambientais de 1 L de água coletadas no rio Cubatão (profundidade de 30 cm) na região da grande Florianópolis/Brasil. As amostras foram coletadas no rio Cubatão (04 amostras), na saída de esgoto doméstico não tratado no rio Cubatão (02 amostras) e na vala de ETE do município de Santo Amaro da Imperatriz (04 amostras). As amostras foram coletadas no período da manhã em recipientes de vidro âmbar, e levadas imediatamente ao laboratório, filtradas e armazenadas sob refrigeração (4 °C) no escuro. As amostras coletadas apresentavam pH na faixa de 7,0 a 7,7. As amostras foram analisadas no prazo máximo de 30 horas após a coleta.

4.2.2.2 Preparo das soluções padrão

Para a solução de trabalho individual, cada fármaco foi pesado na concentração de 10 mg e foi diluído em metanol em balão de 10 mL. Para a confecção da solução mãe MIX na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi adicionado 1 mL de cada padrão individual em balão de 10 mL e completou-se com metanol. Sendo esta solução usada para a fortificação das amostras e preparação das diluições para a realização das curvas analíticas.

4.2.2.3 Estudo das condições cromatográficas

Para verificar as condições que forneceriam o melhor desempenho na separação dos compostos, com uma boa resolução e um tempo de corrida não muito longo foram testados diferentes condições cromatográficas. Foram testadas diferentes composições para a fase móvel: acetonitrila e água (pH 2,9); metanol e água; metanol e água + 0,1 % ácido acético e acetonitrila e água + 0,1 % de ácido acético. Para cada mistura de solvente citado anteriormente, foram testadas diferentes proporções dos solventes ao longo do tempo (gradiente) e diferentes vazões da fase móvel também foram avaliadas. Também foi verificado o valor de comprimento de onda no qual cada fármaco apresentava uma maior absorvância, e foi submetido o padrão mix a várias corridas cromatográficas em diferentes comprimentos de onda (245, 249, 254, 296, 285 e 273 nm). Posteriormente foi realizada uma avaliação da separação cromatográfica dos compostos estudados por HPLC. Os parâmetros avaliados foram, tempo de retenção (t_R), fator de retenção (k), resolução (R) e fator de assimetria (T). O fator de assimetria foi calculado a 10% da altura do pico cromatográfico.

4.2.2.4 Metodologia analítica

Um fluxograma simplificado da metodologia analítica para determinação de fármacos por SPE e HPLC esta representado na **Figura 10** e os parâmetros otimizados serão apresentados no item 4.2.2.5.

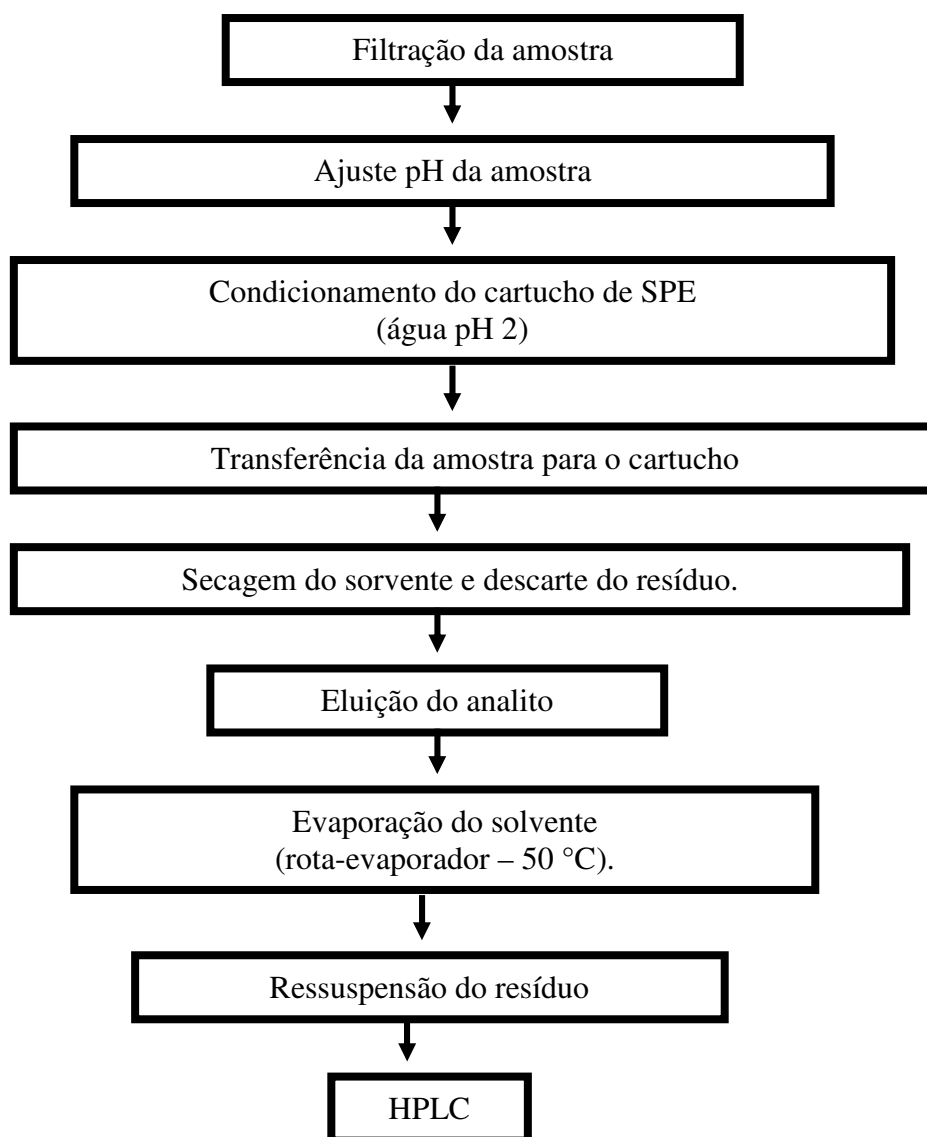


Figura 10: Fluxograma da metodologia analítica de SPE e HPLC

4.2.2.5 Otimização da metodologia

A otimização realizada foi univariável com a seleção de seis parâmetros, em diferentes níveis (**Tabela 13**), que poderiam afetar a eficiência na extração e pré-concentração da amostra. Os parâmetros e níveis avaliados foram: pH da amostra; sorvente de extração; vazão de passagem de amostra; solvente de eluição; volume de eluição e volume de capacidade do

sorvente. Para otimização da metodologia foi utilizado como matriz água milli-Q fortificada artificialmente, no volume de 100 mL, com exceção do volume de capacidade do sorvente, sendo os experimentos realizados em duplicata.

Tabela 13: Variáveis e níveis estudados para a otimização univariada da metodologia para determinação de fármacos por SPE e HPLC.

Variáveis	Níveis avaliados
pH da amostra	2, 3, 4, 6 e 7
vazão da amostra	3; 16 e 50 mL/min
solvente de extração	acetato de etila, metanol, etanol, acetona, acetonitrila, metanol:acetonitrila (50:50 v/v), acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v) e metanol:acetato de etila (50:50 v/v)
volume de solvente de extração	3; 5; 10 e 15 mL
sorvente de extração	C18 e Nexus
volume de capacidade do sorvente	100, 250, 500, 750 e 1000 mL

4.2.2.6 Validação da metodologia

Os testes foram desenvolvidos conforme a ANVISA [124, 125] e nas diretrizes da ICH [126-127]. Os cálculos necessários para a validação foram efetuados utilizando os softwares Microsoft Excel® e Microcal Origin®.

A calibração do instrumento foi realizada a partir da curva analítica, obtida pela injeção de solução padrão, em triplicata, na faixa de concentração de 20 a 20000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os valores de limite de detecção e quantificação do instrumento foram calculados a partir das curvas analíticas, sendo: $\text{LOD} = 3,3 \times s / b$ e $\text{LOQ} = 10 \times s / b$, onde s = desvio padrão do coeficiente linear da curva e b = coeficiente angular da curva. Para o cálculo do LOD e LOQ do método foi utilizado a mesma fórmula citada para o instrumento, no entanto foi usado como valor de “s” o desvio padrão do ruído do branco.

Para a obtenção da linearidade do método analítico, amostras de água de torneira foram fortificadas com solução padrão na faixa de concentrações de 1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (triplicata) e foram submetidas à metodologia otimizada.

Para a verificação da recuperação do método de SPE foram fortificadas amostras de água de torneira, fortificadas artificialmente e submetidas à metodologia otimizada, usando a

curva analítica da metodologia para quantificação da recuperação. Os níveis de fortificação foram: 11 e 33; 14,6 e 43,8; 10,8 e 32,4 e 10,4 e 31,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco, respectivamente. A recuperação foi avaliada após todas as etapas de extração e concentração terem sido efetuadas. Determinou-se quanto do composto adicionado ao branco foi quantificado através da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{quantidade obtida (conc. ou massa)}}{\text{quantidade adicionada}} \times 100$$

Amostras de água (branco), sem os analitos estudados (ou abaixo do LOD), foram submetidas ao procedimento analítico para verificar a especificidade do método.

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.3.1 Estudo das condições cromatográficas

Devido à diferença de polaridade dos fármacos, a separação isocrática não foi adequada, pois os últimos picos ficaram largos, com baixa eficiência e com tempo de eluição muito grande. Assim a eluição por gradiente foi a melhor alternativa. Para a composição da fase móvel (FM), foi escolhido os solventes acetonitrila:água:ácido acético que apresentaram os melhores resultados comparado com as outras misturas de solventes testadas (acetonitrila:água:ácido fosfórico; metanol:água e metanol:água:ácido fosfórico). O gradiente utilizado foi: inicial de 25 a 85% de acetonitrila em 11 minutos; foi mantida essa proporção até 15 minutos e em seguida retornou-se a proporção de solvente inicial por 4 minutos (para equilíbrio e estabilização do sistema), totalizando um tempo de análise de 19 minutos. Na **Figura 11** pode ser visualizada a melhor separação cromatográfica obtida para os fármacos estudados.

Os comprimentos de onda de absorção máxima para os fármacos analisados são 245, 296, 285 e 273 nm para paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco, respectivamente. Como se observa os comprimentos de onda são diferentes, então foi necessário estabelecer um comprimento de onda fixo, que fosse possível analisar todos os compostos. Após a solução padrão mix ser submetida a várias corridas cromatográficas em diferentes comprimentos de onda, 249 nm foi escolhido como valor fixo para as análises seguintes. Embora a maioria dos compostos não apresente seu máximo de absorvância nesse valor, levando a limites de detecção mais altos, este comprimento de onda forneceu bons resultados de absorção para os quatro compostos.

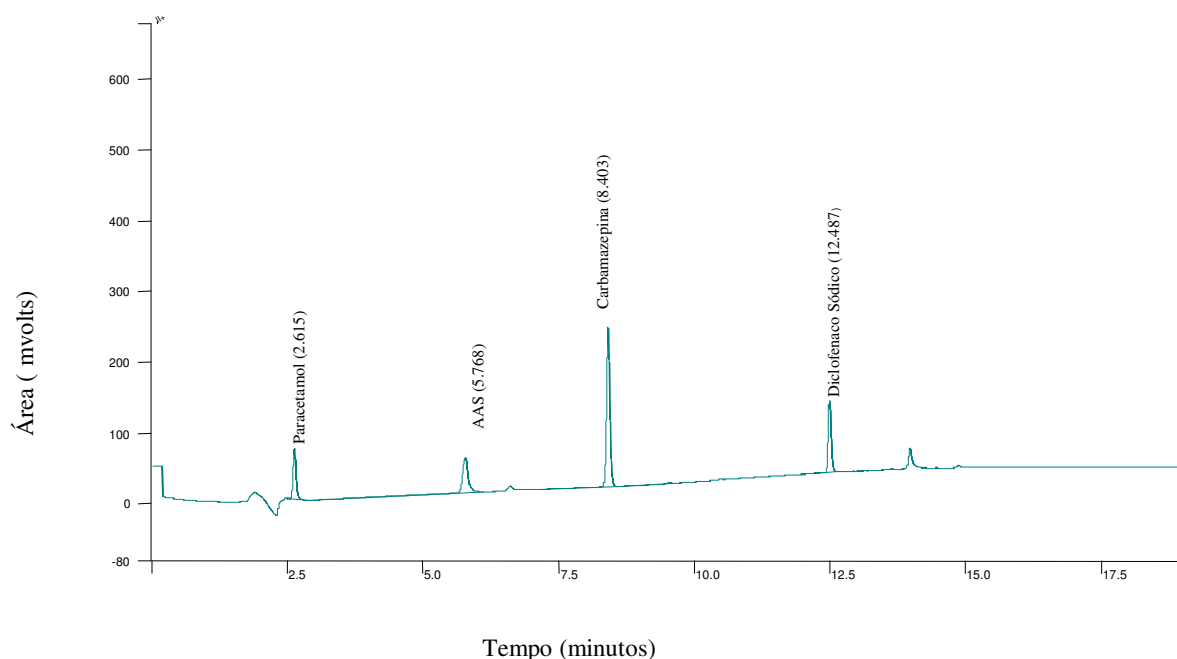


Figura 11: Cromatograma obtido de uma solução padrão na separação de Paracetamol, AAS, Carbamazepina e Diclofenaco por SPE e HPLC. Condições cromatográficas: fase móvel gradiente: acetonitrila: água + 0,1% de CH_3COOH , gradiente inicial de 25 até 85% de acetonitrila em 11min, 85% de acetonitrila: 15% água até 15 min, e 25 de água:85% de acetonitrila até 19 minutos; Coluna C18; Vazão de 1,0 mL/min; Vol. injeção: 20 μL ; detecção: 249 nm;

A **Tabela 14** apresenta os resultados obtidos do sistema *system suitability* para os 4 fármacos. Os parâmetros analisados foram: tempo de retenção; fator de retenção; resolução e fator de assimetria.

Tabela 14: Parâmetros cromatográficos de verificação do sistema obtido para a separação da mistura de fármacos na melhor condição cromatográfica (Cromatograma da **Figura 11**).

Fármaco /parâmetro	t_R^a (min)	K^b	R^c	T^d
Paracetamol	2,62	1,62	-	1,22
AAS	5,77	4,77	19	1,25
Carbamazepina	8,40	7,40	15	1,07
Diclofenaco	12,48	11,49	37	1,24

^a tempo de retenção; ^b fator de retenção; ^c resolução; e ^d fator de assimetria

Pelos valores obtidos, conclui-se que a separação cromatográfica foi adequada, pois os valores obtidos para a resolução de todos os picos foram maiores que 2,0, os valores de K estão dentro da faixa de 1 a 12 e os valores do fator de assimetria estão próximos da unidade (um) indicando a assimetria dos picos e minimizando erros na quantificação.

Na avaliação da repetibilidade do sistema cromatográfico, foi verificada uma variação (estimativa de desvio padrão relativo) de 0,32; 0,35; 0,11 e 0,07% para os tempos de retenção (n=10) de paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco, respectivamente. Estando, portanto dentro da variação de 3%, admitida para resultados obtidos no uso rotineiro. O nº de pratos da coluna (N) utilizada (Pursuit- C18) foi maior que 10887 para a mistura de fármacos analisada.

A otimização das condições cromatográficas foi realizada com solução padrão das substâncias de referências, sendo a identificação dos picos obtida por meio da comparação entre os tempos de retenção dos analitos na mistura e injeções de cada fármaco em solução individual. Também para confirmação da identidade dos compostos analisados, soluções padrões e uma amostra (água de rio) contaminada artificialmente e extraída através da metodologia otimizada, foram submetidas ao processo de separação em duas colunas cromatográficas diferentes C8 e C18 e também a detecção foi realizada em dois comprimentos de ondas diferentes 249 e 285 nm. O segundo λ de 285 nm foi escolhido pelo fato de AAS, carbamazepina e diclofenaco apresentarem um acréscimo na sua área devido a sua absorção estar muito próxima do ponto máximo de absorção desses fármacos. Na **Figura 12** pode ser observado um cromatograma com as corridas cromatográficas sobrepostas realizadas em 249 e 285 nm.

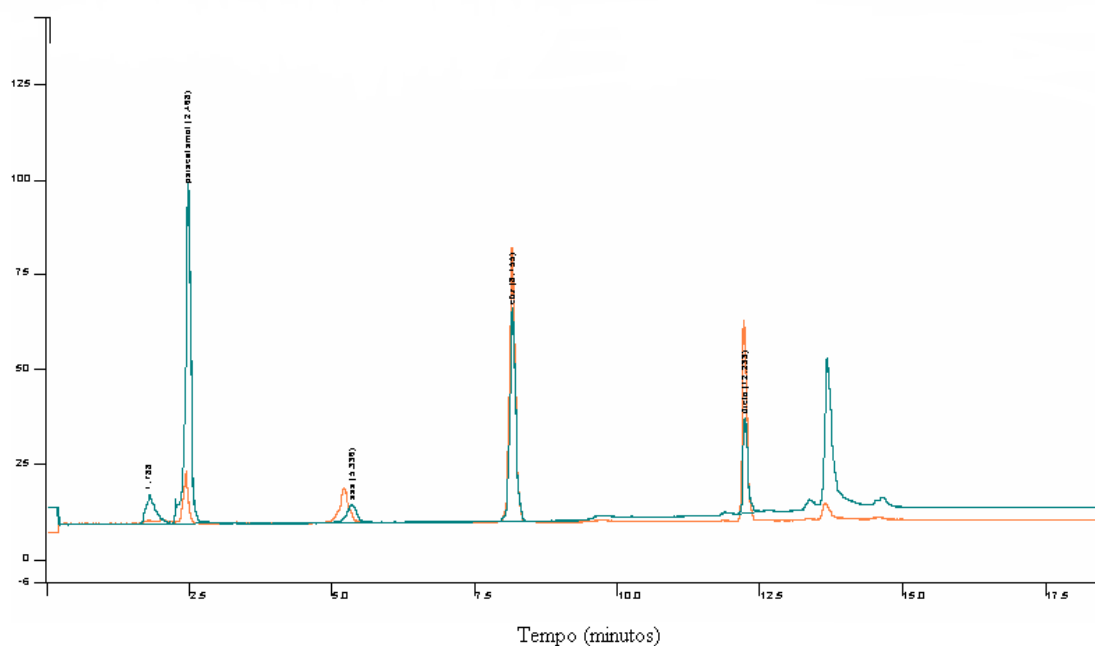


Figura 12: Cromatogramas sobrepostos em dois comprimentos de onda obtidos para solução padrão de Paracetamol, AAS, Carbamazepina e Diclofenaco: leitura em 249 nm na cor verde; leitura em 285 nm na cor laranja. Condições cromatográficas: FM gradiente: acetonitrila: água + 0,1% de CH_3COOH ; Coluna C18; Vazão de 1,0 mL/min; Vol. injeção: 20 μL .

4.3.2 Otimização da metodologia para análise de fármacos por SPE

No processo de otimização univariado do método, foram estabelecidas condições iniciais para a avaliação das variáveis. Sendo utilizada a concentração de otimização de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, sorvente C18, pH 3, vazão média de 3,3 mL min^{-1} com auxílio de bomba à vácuo, solvente de extração metanol, volume do solvente de extração de 10 mL e volume de amostra de 100 mL. Após cada variável realizada, definiu-se o melhor nível e este foi adotado para os testes seguintes.

- **Avaliação do pH da amostra**

A etapa de ajuste de pH foi realizada, nos níveis 2, 3, 4, 6 e 7 para verificar em qual pH seria encontrada melhor recuperação para os fármacos estudados. As variáveis fixas foram: sorvente C18, vazão média de amostra de 3,3 mL min^{-1} com auxílio de bomba à vácuo, solvente de extração metanol, e volume do solvente de extração de 10 mL. Os resultados encontrados podem ser visualizados na **Figura 13**.

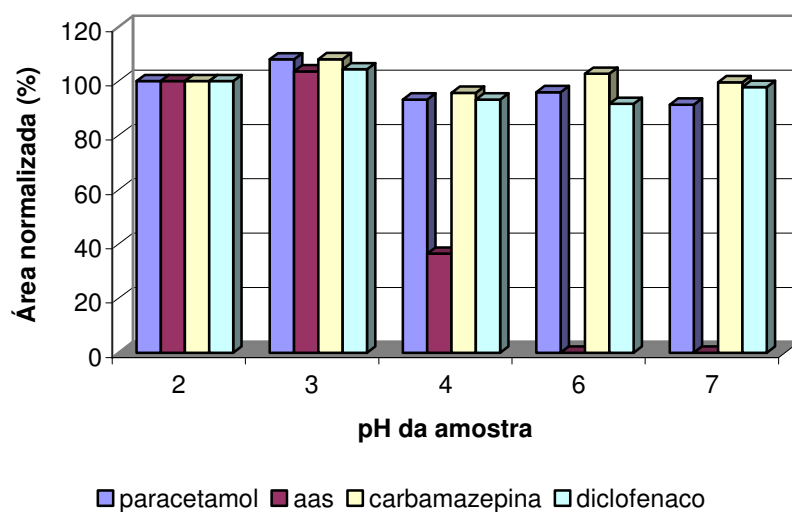


Figura 13: Resultados obtidos para a otimização da variável *pH* através de SPE e HPLC.

Analisando a **Figura 13**, verifica-se que o AAS foi o único fármaco que apresentou um perfil bem definido com a alteração do pH. Devido a sua característica ácida, em pH menor o AAS, na forma não ionizada, interage com o sorvente, ficando mais retido. Em pH elevado essa interação diminui e ocorre perda na sua recuperação. Para o diclofenaco e a carbamazepina foi observado que a recuperação não foi afetada drasticamente pela variação do pH e o paracetamol apresentou uma ligeira diminuição na sua extração em pH neutro. Santos *et al.* [142] avaliaram a extração de fármacos antiinflamatórios e drogas antiepiléticas usando cartucho Oasis HLB e também verificaram que quando amostras foram acidificadas em pH 2 a eficiência da extração para diclofenaco e carbamazepina foi similar àquela obtida nas amostras em pH neutro. Como compromisso para extração de todos os compostos estudados e verificando que os resultados em pH 2 e 3 foram semelhantes, definiu-se o pH da amostra em três para os demais testes.

- **Sorvente utilizado na extração**

Foram testados dois tipos de sorvente: Nexus (polimérico) e C18, sendo as variáveis fixas: pH 3, vazão de $3,3 \text{ mL min}^{-1}$, solvente de eluição metanol e volume do solvente de 10 mL. Como pode ser observado na **Figura 14** o sorvente Nexus apresentou uma maior recuperação para a maioria dos compostos e foi escolhido como sorvente para os próximos testes.

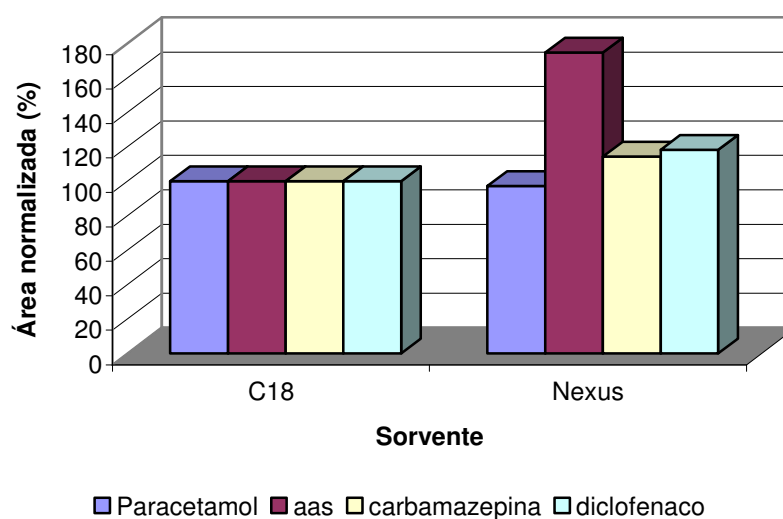


Figura 14: Resultados obtidos na otimização da variável *sorvente*.

Os sorventes poliméricos são recomendados para substâncias de média à alta polaridade, nos quais elas podem apresentar recuperação maior que sorventes de alquilsílica de fase reversa ou extração líquido-líquido [68], assim para extração de analitos de alta polaridade, sorventes poliméricos frequentemente são superiores aos sorventes de sílica alquilada (C18) [08].

Na literatura é reportado que Nexus assim como outros sorventes poliméricos como Chromabond EASY e Oasis HLB não necessitam de uma etapa de condicionamento antes da passagem da amostra [31, 143, 144]. Contudo, alguns estudos afirmam que a eficiência de extração com o sorvente Nexus pode diminuir, quando não é realizado essa etapa de condicionamento [31, 145], devido a alta resistência encontrada na passagem da amostra e também a problemas de coeluição dos analitos [31]. Weigel *et al.* [31] relatam que quando comparado à eficiência da extração com e sem condicionamento do cartucho Nexus, foram observados que as recuperações de diversos fármacos foram reduzidas e também uma resistência mais elevada do fluxo foi causada pelos filtros hidrofóbicos do polietileno quando não foram condicionados antes da extração. Assim, na comparação de sorventes desse trabalho foi realizada a etapa de condicionamento do cartucho para efetivamente realizar o mesmo processo de extração nas duas fases estudadas e evitar possíveis perdas na recuperação.

- **Vazão da amostra**

A velocidade de passagem da amostra deve ser avaliada, pois ela pode ser crítica em alguns casos. Idealmente a passagem deve ser lenta, no entanto como em amostras ambientais é necessário passar um volume grande de amostra, é necessário o auxílio de vácuo ou pressão aplicada a essa etapa. Foram testadas três velocidades de vazão nesse trabalho: vazão por gravidade sem auxílio de bomba a vácuo (média de 3 mL min⁻¹); vazão com auxílio de bomba à vácuo de 16 mL min⁻¹ e 50 mL min⁻¹. As variáveis fixas foram: pH 3, sorvente Nexus, solvente de eluição metanol e volume do solvente 10 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 15**.

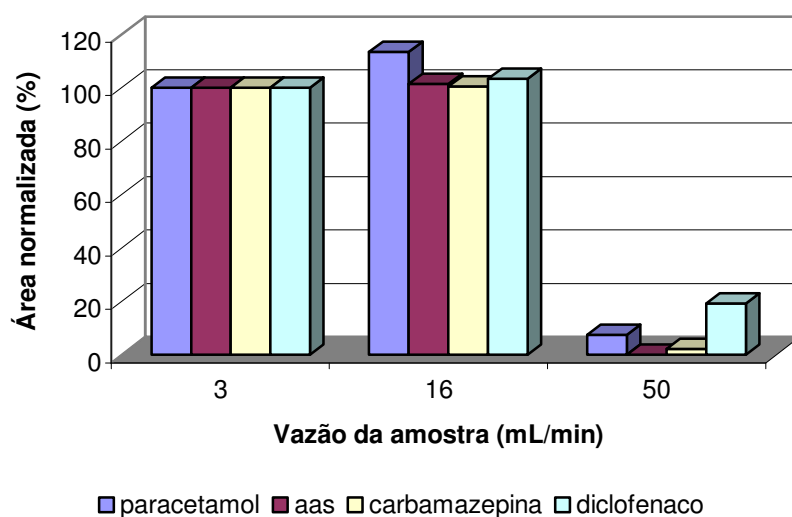


Figura 15: Resultados obtidos para a otimização da variável *vazão da amostra*.

Verificando os resultados encontrados, para os quatro fármacos, observa-se que na vazão de 3 e 16 mL min⁻¹ as amostras apresentam uma recuperação melhor quando comparada a vazão 50 mL min⁻¹. Não foram observadas grandes diferenças entre as duas vazões menores, podendo ambas serem usadas dependendo do volume da amostra. Quando a amostra foi submetida à vazão de 50 mL min⁻¹ a recuperação caiu de maneira drástica. Isto provavelmente ocorreu devido à formação de canais preferências por onde a amostra percorre, sem ter o tempo necessário para ocorrer à adsorção dos analitos no sorvente de forma eficiente, levando a perdas na recuperação dos analitos. Assim foi definido como vazão para as demais variáveis da otimização a vazão de 3 mL min⁻¹, sem auxílio de bomba à vácuo, para os experimentos de otimização, pois o sorvente nexus não oferecia resistência a passagem da

amostra de água. Quando definido o valor de amostra de 1000 mL foi utilizado vazão média de 16 mL min^{-1} .

- **Solvente de eluição do analito**

A escolha do solvente de eluição é importante, pois ele deve eluir os analitos de interesse e não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior. Assim foram avaliados os solventes: acetato de etila, metanol, etanol, acetona, acetonitrila, metanol:acetonitrila (50:50 v/v), acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v) e metanol:acetato de etila (50:50 v/v). As variáveis fixas foram: sorvente Nexus, pH 3, volume do solvente 10 mL e vazão média de 3 mL min^{-1} . Os resultados obtidos para os solventes testados estão apresentados na **Figura 16**.

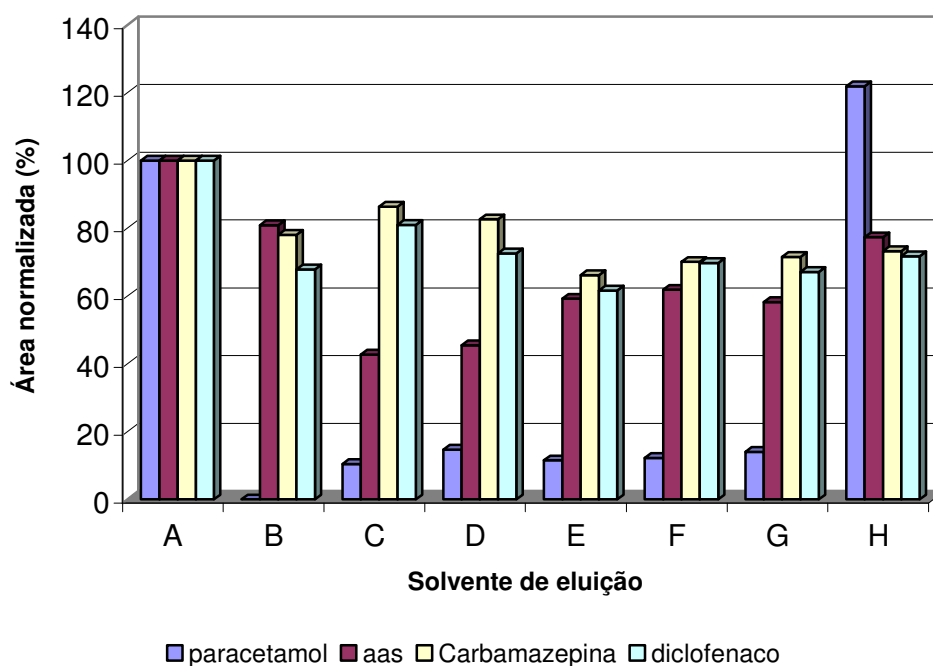


Figura 16: Resultados obtidos para a otimização da variável *solvente de eluição* do analito. Sendo (A) acetonitrila:acetato de etila 50:50 v/v; (B) acetona; (C) acetato de etila; (D) acetonitrila; (E) metanol; (F) metanol:acetonitrila 50:50 v/v; (G) metanol:acetato de etila 50:50 v/v ; (H) etanol.

Analisando a **Figura 16** observa-se que quando testados misturas de solventes essas soluções tiveram resultados de recuperação melhores que os valores obtidos com solventes individuais e a mistura acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v) apresentou os melhores resultados de recuperação para os 4 fármacos estudados. Entre os solventes mais utilizados

para a eluição de fármacos estão o acetato de etila [23, 30, 52, 142], metanol [12, 28, 31, 48] e o acetato de etila:acetona (50:50 v/v) [32, 146].

- **Volume do solvente de eluição do analito na SPE**

Para a avaliação do volume do solvente de eluição do analito foram avaliados 4 volumes de solvente: 3, 5, 10 e 15 mL, utilizando sorvente Nexus, pH 3 e vazão de 3 mL min⁻¹. Os resultados são mostrados na **Figura 17**.

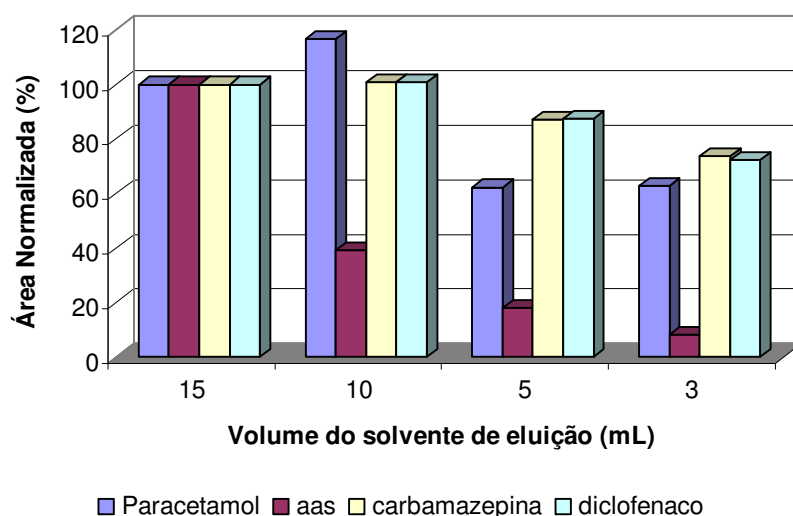


Figura 17: Resultados obtidos para a otimização da variável *volume do solvente*.

É observado na **Figura 17** que o volume de 15 mL apresentou uma melhor recuperação para todos os 4 fármacos estudados e este foi definido como o volume a ser utilizado nos próximos testes.

- **Volume de capacidade do sorvente**

Para determinação do volume da capacidade do sorvente, soluções aquosas de fármacos com diferentes volumes e concentrações, mas a mesma massa (10 ug) foram submetidas à extração. As condições de extração foram sorvente Nexus, pH 3, solvente de eluição acetonitrila:acetato de etila (50:50), volume do solvente de 15 mL e vazão de 16 mL min⁻¹. A **Figura 18** apresenta os resultados encontrados na determinação do volume de capacidade do sorvente para os fármacos estudados.

Na determinação do **volume de capacidade do sorvente**, verificou-se que os fármacos carbamazepina e diclofenaco apresentam uma faixa ampla de volumes de amostra (100 a 1000 mL) onde estes tiveram boas recuperações, não sendo afetada drasticamente pela

variação do volume da amostra. Já para paracetamol e AAS foi encontrado os melhores resultados de recuperação para os menores volumes de amostra (100 e 250 mL), observando que com o aumento do volume da amostra ocorreu uma diminuição na recuperação do composto. Mesmo observando essa perda na recuperação para os dois analitos, optou-se pelo volume de extração de 1000 mL para os testes seguintes. É importante observar que as pesquisas que envolvem determinação de fármacos em água utilizam volumes de amostra de 1000 mL ou mais, devido aos fármacos estarem presentes nesse meio em quantidades muito baixas.

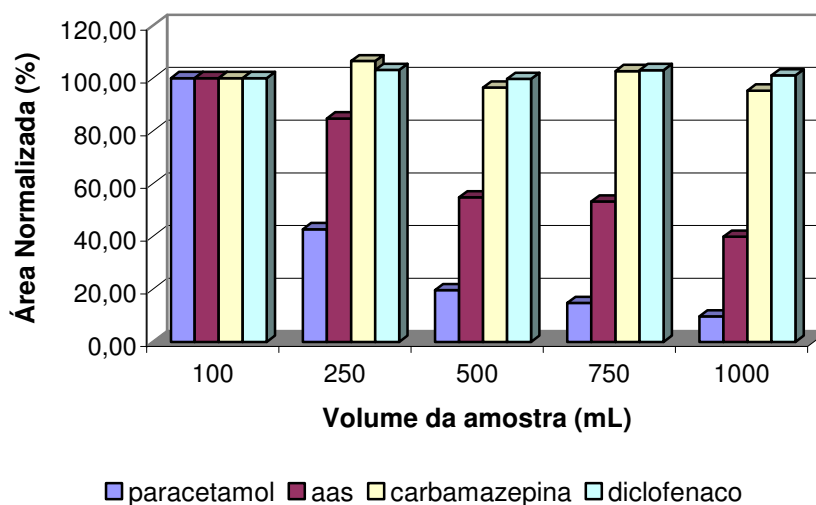


Figura 18: Estudo do volume de capacidade do sorvente na extração de fármacos em água.

Assim os melhores valores definidos na otimização de cada parâmetro foram utilizados para testes de validação e amostras reais. A metodologia otimizada consistiu de amostra com volume de 1000 mL, pH 3, vazão da amostra de 16 mL min^{-1} , sorvente Nexus e eluição do analito com 15 mL da mistura de solvente acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v).

4.3.3 Validação do método analítico

Os resultados obtidos na calibração do instrumento indicaram boa linearidade em toda a faixa estudada e a **Figura 19** e a **Tabela 15** apresentam os parâmetros cromatográficos obtidos no instrumento. O coeficiente angular representa a sensibilidade do detector. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração. Os coeficientes angulares das curvas analíticas apresentam a seguinte ordem de sensibilidade: paracetamol > carbamazepina > diclofenaco > AAS. Os coeficientes de correlação acima de 0,99 mostram uma relação linear de x a y nas curvas

analíticas, indicando uma dispersão pequena do conjunto de pontos experimentais e uma incerteza menor dos coeficientes de regressão estimados [108,109].

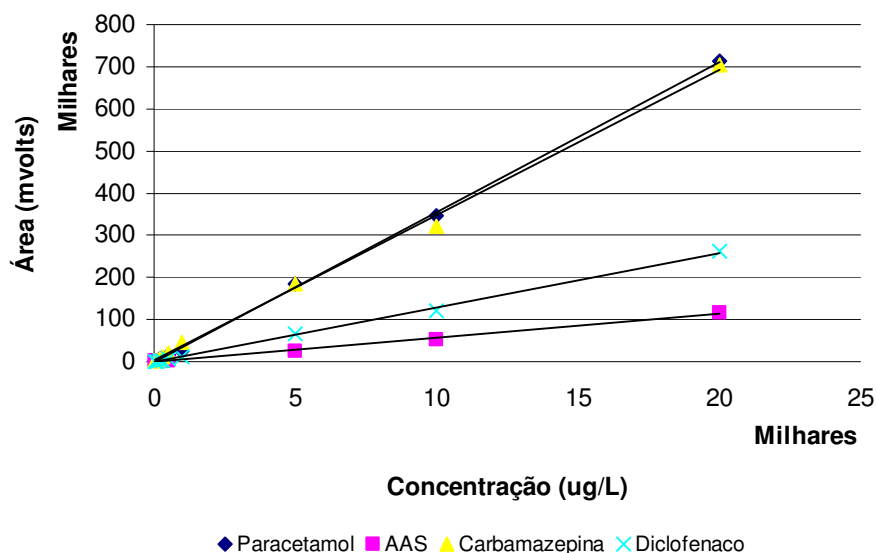


Figura 19: Curva analítica do equipamento obtida para os 4 fármacos estudados.

Tabela 15: Parâmetros obtidos para a linearidade do equipamento.

Fármaco	Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	n ^a	Coefficiente ângular	Coefficiente linear	r ^b
Paracetamol	19,6 - 20000	9	35,66	- 2184,23	0,9998
AAS	188,4 - 20000	8	5,67	- 262,05	0,9985
Carbamazepina	141,2- 20000	8	34,56	1901,53	0,9989
Diclofenaco	355,5 - 20000	7	13,02	-1874,27	0,9993

^a número de pontos; ^b coeficiente de correlação

Os parâmetros analíticos obtidos para a metodologia analítica podem ser observados na **Tabela 16**. Quanto à linearidade da metodologia estudada, foi observado boa linearidade com coeficientes de correlação acima de 0,99. A faixa linear foi de 2,6 a 31; 1,6 a 47,4; 1,1 a 33,6; e 1 a 30,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco, respectivamente. Os valores de LOD e LOQ para a metodologia foram de 0,74 e 2,24; 0,13 e 0,38; 0,03 e 0,08 e 0,12 e 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ para paracetamol, AAS, carbamazepina e diclofenaco, respectivamente.

Tabela 16: Parâmetros analíticos para determinação de fármacos por SPE e HPLC.

Fármacos / Parâmetros analíticos	Equação da reta $y = a + bx$		R^c	Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$) metodologia (n=5)	LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)		LOQ ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	a	b			Eq. ^d	Met. ^e	Eq.	Met.
Paracetamol	-123,5	566,8	0,9903	2,6 - 31	6,5	0,74	19,6	2,24
AAS	232,8	1640,2	0,9985	1,6 - 47,4	62,2	0,13	188,4	0,38
Carbamazepina	20941,2	30834	0,9971	1,1 - 33,6	46,6	0,03	141,2	0,08
Diclofenaco	7508,5	13198,3	0,9988	1 - 30,6	195,5	0,13	355,5	0,37

^a limite de detecção; ^b limite de quantificação; ^c coeficiente de correlação; ^d equipamento; ^e metodologia.

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o instrumento e para método podem ser considerados aceitáveis, no entanto estes valores são influenciados pelo tipo de detector e pelo comprimento de onda adotado, assim provavelmente seriam menores, se fossem obtidos em detectores mais específicos, como por exemplo, os detectores DAD e MS. Outro fato que deve ser levado em consideração é a variação da linha de base no decorrer da corrida cromatográfica, isso provavelmente devido à porcentagem de solvente orgânico que foi aumentada. Essa subida da linha de base implica em menor detectabilidade e problemas durante a integração, levando a valores de LOD e LOQ mais altos [79].

A eficiência da recuperação foi avaliada em amostras de água de torneira, em dois níveis de fortificação, em triplicata, para os quatro fármacos estudados. Para o paracetamol encontrou-se recuperação de 68 ± 15 e 82 ± 18 % para os níveis de 11 e $33 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O composto AAS teve recuperação de 100 ± 13 e 83 ± 14 % para os níveis de 15 e $44 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Carbamazepina apresentou recuperação de 86 ± 9 e 83 ± 11 % para os níveis de 11 e $32 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O fármaco diclofenaco recuperou 95 ± 3 e 86 ± 10 % nos níveis de 10 e $31 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Portanto, os resultados de recuperação e precisão, encontrados para os quatro compostos estudados, foram na faixa de 68 a 100% e 3 a 18 %, respectivamente.

Na literatura são encontrados valores de recuperação para paracetamol de 61% usando cartucho C18 e 75% quando foi usado cartucho Phenomenex Strata [12]. Para o AAS foram encontrados valores de recuperação de 101,8% com cartucho Oasis [37]. As recuperações encontradas para carbamazepina são de 95% usando cartucho Nexus e valores de 101% [31], 109,7% [37] e 80 a 115% [32] quando usado cartucho Oasis HLB. Já para o fármaco diclofenaco, são relatadas recuperações de 145% [38] e 44% com cartucho C18 [12], valores de 114% [38], 102% [31] e 93 a 110% [32] utilizando Oasis HLB. Para o cartucho Nexus e phenomenex Strata são relatadas recuperação de 90% [31] e 62 % [12], respectivamente para diclofenaco.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade de duas amostras de água de torneira fortificadas na concentração de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$). Para o nível de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos valores de RSD de 9,8; 4,8; 14 e 18% para diclofenaco, carbamazepina, AAS e Paracetamol, respectivamente. Para o nível maior, $100 \mu\text{g L}^{-1}$, os valores encontrados foram 4,0; 3,6; 9,9 e 12,9% para os quatro compostos respectivamente. Os valores encontrados estão dentro dos critérios de aceitabilidade (20%) descritos na literatura [109].

4.3.4 Amostras reais

Amostras de água de rio e córrego de efluente de ETE foram submetidas ao método otimizado para verificar a presença dos fármacos estudados. Os extratos das amostras reais foram submetidos à leitura em comprimento de onda (λ) fixo de 249 nm e confirmação em 285 nm. Não foi encontrada a presença de nenhum analito acima do limite de detecção do método nas amostras reais analisadas.

Embora não tenha sido encontrado resíduo de fármacos neste grupo de amostras avaliadas, novas amostragens devem ser realizadas, com a investigação em novos pontos de amostragem e também por um período de tempo maior. Também outros detectores como DAD e MS devem ser usados para melhorar os limites de detecção e quantificação dos analitos.

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL

As condições cromatográficas utilizadas, fase móvel composta pelo gradiente de acetonitrila:água:ácido acético com vazão de 1 mL min^{-1} apresentou bons resultados para a separação da mistura de fármacos estudados.

Todos os fármacos apresentaram boa linearidade tanto no instrumento quanto na metodologia atingindo coeficiente de correlação maior que 0,99.

A calibração realizada na matriz apresentou bons resultados, considerando a técnica utilizada, para LOD e LOQ para a análise dos quatro fármacos.

A otimização univariada dos parâmetros pH, sorvente de extração, vazão da amostra, solvente de eluição e volume do solvente de eluição forneceu informações importantes sobre o comportamento dos fármacos nas condições testadas e indicaram os melhores níveis de cada parâmetro, permitindo assim que os quatro fármacos sejam analisados segundo o procedimento de extração otimizado.

A técnica de HPLC-UV fornece bons resultados e, portanto pode ser usada para o desenvolvimento de metodologias para a determinação de fármacos em água, no entanto detectores mais específicos devem ser testados para melhorar o desempenho do método.

CAPÍTULO 5

Extração simultânea de fármacos ácidos e básicos em água residual através da técnica de microextração em fase sólida.

5.1 INTRODUÇÃO

Constituindo uma excelente alternativa aos métodos clássicos de determinação de fármacos no meio ambiente, a SPME é rápida, sensível e livre de solvente quando for acoplada à GC, além de ser um método econômico de preparação de amostra para análise por cromatografia gasosa, líquida e eletroforese capilar [147]. Considerando que a eficiência da pré-concentração dos analitos depende de muitos parâmetros, tais como o tipo de recobrimento da fibra, pH da amostra, modo de extração, força iônica, temperatura e tempo de extração [147, 148] a otimização dessas condições é sempre necessária. Modelos experimentais, como métodos multivariados, incluindo planejamentos fatoriais e superfícies de respostas vêm sendo usados para examinar o efeito principal e as interações sobre a resposta analítica, além de otimizar as variáveis simultaneamente, com um número reduzido de experimentos.

Um número grande de metodologias analíticas para determinação de fármacos está disponível atualmente, sendo grande parte voltada para determinação de compostos contendo polaridade, estrutura ou atividade similares [52]. Assim, o desenvolvimento de métodos multirresíduos é requerido para avaliar apropriadamente a presença desses compostos em matrizes ambientais. Portanto, o objetivo desse capítulo foi desenvolver uma metodologia multirresíduo, com extração simultânea de fármacos com características ácidas e básicas, ou seja, com uma única extração em duas etapas, na qual na primeira a extração é processada em pH 2,5 para extração dos compostos ácidos (ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco) e a segunda etapa em pH 7,0 para extração de compostos básicos (diazepam e loratadina). Esta mudança de pH é realizada visando um único procedimento de extração para compostos com diferentes características físico-químicas, buscando uma maior eficiência de extração para ambas as classes. Utilizou-se SPME para a pré-concentração e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para detecção. A otimização foi realizada através do planejamento fatorial completo e da metodologia de superfícies de resposta de acordo com a matriz Doehlert e planejamento Composto Central.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 Materiais

5.2.1.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados para preparação de soluções foram:

- Metanol, grau HPLC, Merck;
- Fosfato de sódio dibásico, Vetec;
- Ácido clorídrico, Vetec;
- Hidróxido de sódio, P.A., Synth;
- Cloreto de sódio, Vetec;
- Água ultrapura (18.2 MΩcm) obtida de um sistema Milli-Q de purificação (Millipore® -Bedford, MA, USA).

5.2.1.2 Padrões

Os padrões dos fármacos ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina foram de pureza acima de 98% (Sigma-Aldrich, MO, USA).

5.2.1.3 *Materiais diversos*

Para o preparo da amostra e procedimento de extração dos analitos foram utilizados os seguintes materiais:

- Holder manual, Supelco (Bellefonte, USA);
- Fibras para SPME (Supelco): Poliacrilato (PA, 85 µm); Polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm); Divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm); Carbowax (CW, 65 µm); Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 µm); Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB, 65 µm);
- Frascos para SPME com tampa de rosca e septo de teflon/silicone de 40 mL;
- Micro seringa (100- 1000 µL), Labmate, HTL;
- Membrana de acetato de celulose, Schleicher & Schuell.

5.2.1.4 Colunas cromatográficas

Foram utilizadas duas colunas cromatográficas, uma coluna capilar OV-5 Specialty Company (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de diâmetro) e uma coluna capilar VF-5ms Factor Four Varian (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de diâmetro).

5.2.1.5 Equipamentos

- Balança analítica OHAUS EXPLORER, mod E12140;
- pHmetro DIGIMED, mod DM21;
- Bomba a vácuo PRISMATEC, mod 131;
- Agitador de tubos MARCONI, mod MA162;
- Agitador Magnético, SNIJDERS, mod 34532;
- Banho termostático com circulação, Nova Técnica.
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14 B:
 - Detector por ionização em chama (FID);
 - Injetor do tipo split/splitless;
 - Gases: nitrogênio ultrapuro, AGA; ar sintético e hidrogênio, White Martins.
- Cromatógrafo a gás CP-3800 Varian:
 - Espectrômetro de massas, Saturn 2100 Ion Trap Varian,
 - Injetor do tipo split/splitless;
 - Gás Hélio ultra-puro (99,99%), White Martins;
 - Software Saturn GC/MS Workstation versão 6.0.

5.2.2 Método

5.2.2.1 Coleta e preparo das amostras

Para a otimização foi utilizada água deionizada fortificada com solução padrão.

Para análise de amostras reais foram coletadas três amostras ambientais:

- duas amostras de efluente de esgoto, recolhidas na estação de tratamento de esgoto do município de Florianópolis (Estação insular);
- uma amostra de esgoto não tratado coletada em córrego ao lado do Instituto de psiquiatria de Santa Catarina localizado no município de São José.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar (1 L), transportadas ao laboratório, filtradas em papel filtro e em seguida em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) com auxílio de um sistema de filtração em vidro sob vácuo. Após a filtração as amostras foram armazenadas sob refrigeração até a extração.

5.2.2.2 Preparo das soluções padrão

Foram preparadas soluções estoque em metanol na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto individualmente. A partir destas foram preparadas soluções de trabalho mix, sendo soluções de fármacos ácidos, soluções de fármacos básicos e solução de trabalho com o conjunto dos cinco compostos na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para se obter novas concentrações adequadas alíquotas dessas soluções foram utilizadas. As soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C .

A solução de fosfato monobásico dissódico para ajuste do pH da amostra foi preparada na concentração de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$, através da pesagem de 2,84 g e diluição em 50 mL de água milli-Q.

5.2.2.3 Estudo das condições cromatográficas

Para o estudo da otimização foi utilizado um GC-FID, coluna capilar OV-5. Foi usado como gás carreador e gás de make-up o gás nitrogênio ultrapuro, com vazão de 1,0 e $30,0 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente. Ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases de combustão. As temperaturas do injetor e detector foram de 270°C e 300°C , respectivamente. A programação de temperatura do forno foi estudada e a melhor condição de separação foi definida como sendo: 80°C por 1 min, $15^\circ\text{C min}^{-1}$ até 300°C e mantendo esta temperatura por 9 min. A injeção foi realizada no modo splitless.

Na etapa de validação foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas empregadas na otimização, porém foi realizada usando GC-MS e coluna capilar VF-5ms. Hélio ultrapuro (99.99%) foi usado como gás carreador na vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Os parâmetros do MS foram: método de ionização por elétrons; relação m/z inicial e final de 40 e 650 respectivamente; aquisição de dados foi a cada 1s e modo de aquisição de dados foi o SCAN (mass scan range).

A identificação dos compostos no GC-MS foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos para os padrões aplicados no sistema e com os espectros disponíveis na biblioteca “NIST” do próprio instrumento, considerando uma similaridade de 70%. Na **Figura 20** estão apresentados os espectros de massas dos compostos estudados.

A **Figura 21** apresenta os cromatogramas obtidos para a extração dos fármacos estudados em pH 2,5 e em pH 7 e extração simultânea dos fármacos.

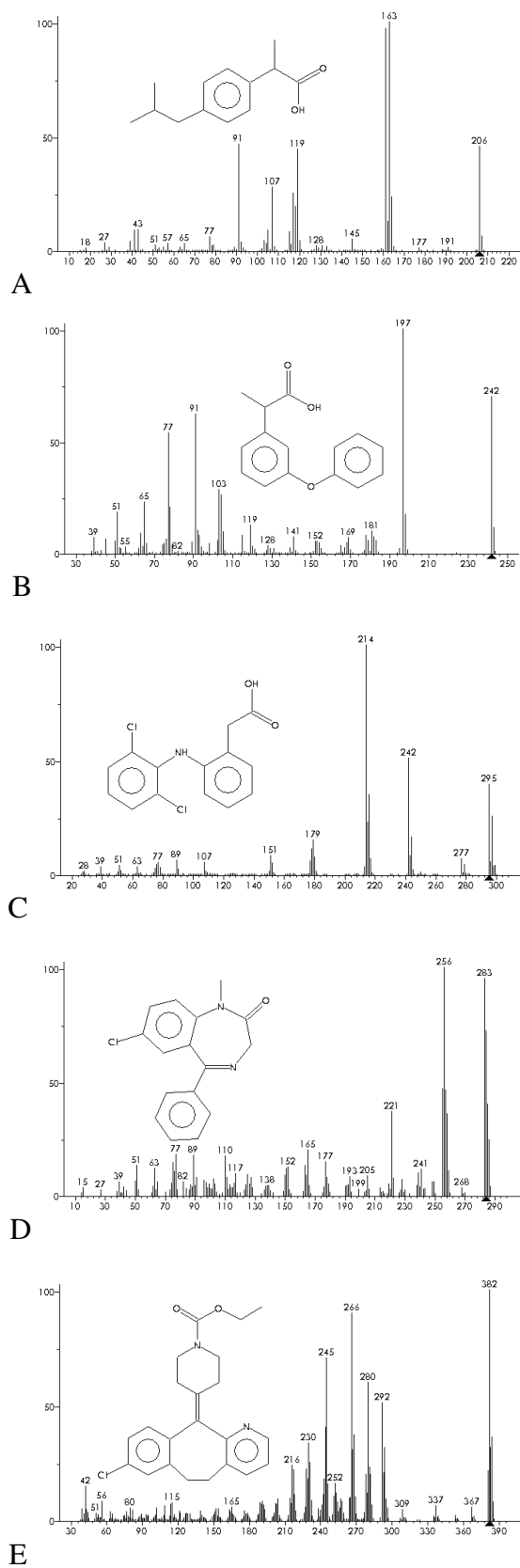


Figura 20: Espectro de massas dos fármacos (A) ibuprofeno, (B) fenoprofeno, (C) diclofenaco, (D) diazepam e (E) loratadina.

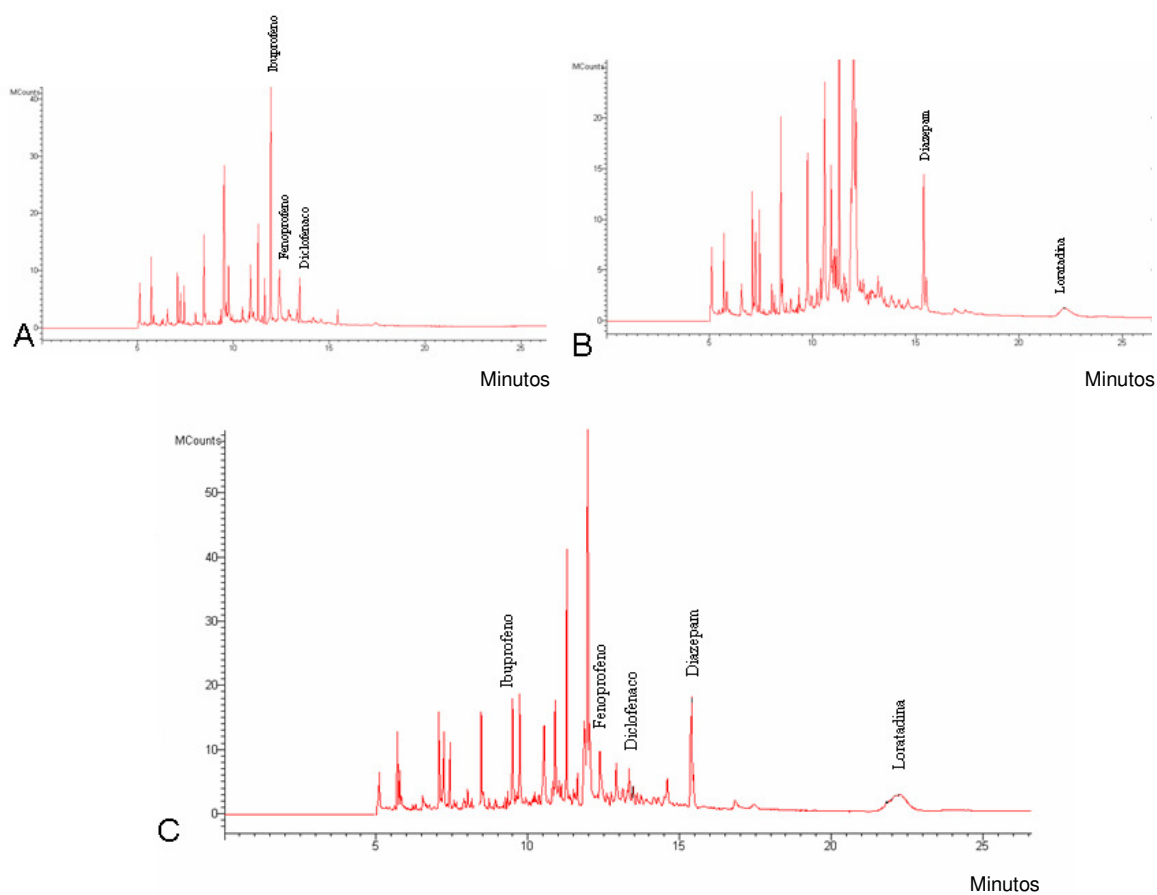


Figura 21: Cromatogramas (TIC) de uma amostra de efluente de tratamento de esgoto fortificada com Ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina. Sendo (A) extração em pH 2,5, (B) extração em pH 7,0 e (C) extração simultânea. A separação foi realizada em coluna capilar VF-5ms com programação de temperatura de 80 °C por 1 min, 15 °C min⁻¹ até 300 °C, mantendo-se estável por 9 min e injeção no modo splitless.

5.2.2.4 Otimização das condições de extração por SPME

Inicialmente foi realizada uma otimização univariada da eficiência de extração das fibras PDMS, CW/DVB, CAR/PDMS, PA e DVB/CAR/PDMS no modo de extração direto, para os cinco analitos estudados. Todas as extrações foram realizadas no modo direto sob agitação constante (com auxílio de um agitador magnético) e volume da amostra de 25 mL.

A seguir a otimização multivariada foi iniciada através da realização de um planejamento fatorial completo 2⁴ (quatro variáveis em dois níveis) com inclusão de um ponto central em quadruplicata (totalizando 20 experimentos), para investigação de uma extração simultânea dos fármacos ácidos e básicos. Este planejamento foi aplicado para verificar se os fatores força iônica, pH da amostra, temperatura e tempo de extração têm ou não influência na

extração desses fármacos. A **Tabela 17** mostra as variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo realizado.

Tabela 17: Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2⁴.

Variáveis/ Níveis	-1	0 ¹	+1
Tempo de extração (min)	20	30	40
pH da amostra	2,5	4	5,5
Força Iônica (g)	0	4,4	8,8
Temperatura (°C)	35	50	65

¹ ponto central estudado

Após esse primeiro estudo, devido às diferenças nas características físico-químicas dos compostos estudados, optou-se pela separação dos fármacos ácidos e básicos e otimização dos dois grupos separadamente. Então, foi aplicado um novo planejamento fatorial completo 2³ para os compostos ácidos e para os compostos básicos, separadamente.

Para os fármacos ácidos o pH da amostra foi fixado em 2,5 e o planejamento fatorial completo 2³ (**Tabela 18**) foi aplicado para as variáveis temperatura de extração (35 e 65 °C), tempo de extração (20 e 40 min) e força iônica (NaCl, 0 e 8,8 g) em dois níveis com inclusão de um ponto central.

Tabela 18: Variáveis e níveis investigados usando o planejamento fatorial completo 2³

Variáveis/ Níveis	-1	0	+1
Tempo de extração (min)	20	30	40
Força Iônica (g)	0	4,4	8,8
Temperatura (°C)	35	50	65

Após a realização desse ensaio para os fármacos ácidos, com base nas variáveis significativas indicadas pelo gráfico de Pareto foi aplicada à metodologia de superfície de resposta, usando a matriz Doehlert, no qual foram realizados nove ensaios, sendo o ponto central em triplicata (**Tabela 19**). Nesta matriz as variáveis avaliadas foram: tempo de extração em cinco níveis (30, 35, 40, 45 e 50 min) e força iônica em três níveis (2,8; 5,8 e 8,8 g).

Tabela 19: Planejamento Doehlert para os fármacos ácidos

Ensaio	NaCl (g)	Tempo de extração (min)
1	5,8	30
2	2,8	35
3	8,8	35
4	5,8	40
5	5,8	40
6	5,8	40
7	2,8	45
8	8,8	45
9	5,8	50

Para os fármacos básicos o pH da amostra foi fixado em 7,0 e o planejamento fatorial completo 2^3 foi aplicado nas mesmas variáveis e níveis apresentados para os fármacos ácidos (**Tabela 18**). A partir dos resultados observados no gráfico de Pareto para os fármacos básicos, aplicou-se novamente a matriz Doehlert, sendo as variáveis otimizadas a temperatura de extração em cinco níveis (50; 57,5; 65; 72,5 e 80 °C) e força iônica em três níveis (2,8; 5,8 e 8,8 g). Ver **Tabela 20**.

Tabela 20: Planejamento Doehlert para os fármacos básicos

Ensaio	NaCl (g)	Temperatura de extração (°C)
1	5,8	50
2	2,8	57,5
3	8,8	57,5
4	5,8	65
5	5,8	65
6	5,8	65
7	2,8	72,5
8	8,8	72,5
9	5,8	80

Definidas as condições ótimas de extração para cada grupo de compostos, foi realizado um planejamento Composto Central objetivando a extração dos dois grupos de fármacos em um único procedimento, ou seja, realizando primeiro a extração dos compostos ácidos e em seguida dos básicos. Assim, estabeleceu-se um compromisso entre as condições ótimas definidas previamente para as variáveis temperatura e força iônica e aplicou-se o planejamento composto central para avaliar o tempo de extração que a fibra permaneceria nas duas condições de pH (2,5 e 7,0). O tempo de extração foi avaliado em cinco níveis 10, 14, 25, 36 e 40 min (**Tabela 21**).

Tabela 21: Níveis investigados no planejamento composto central para os 5 compostos estudados.

Ensaio	Tempo extração pH 2,5/	Tempo extração pH 7,0/
	Níveis	Níveis
1	14 (-1)	14 (-1)
2	14 (-1)	36 (+1)
3	36 (+1)	14 (-1)
4	36 (+1)	36(+1)
5	10 (-1,41)	25 (0)
6	40 (+1,41)	25 (0)
7	25 (0)	10 (-1,41)
8	25 (0)	40 (1,41)
9	25 (0)	25(0)
10	25 (0)	25 (0)

Para aumentar o tempo de vida útil da fibra utilizada, a mesma era lavada em água milli-Q após a extração no modo direto e antes da etapa de dessorção.

O programa Statistica 6.0 foi usado para o tratamento dos dados de otimização multivariada.

Um fluxograma da otimização das condições de extração por SPME realizada para as três metodologias pode ser observado na **Figura 22**.

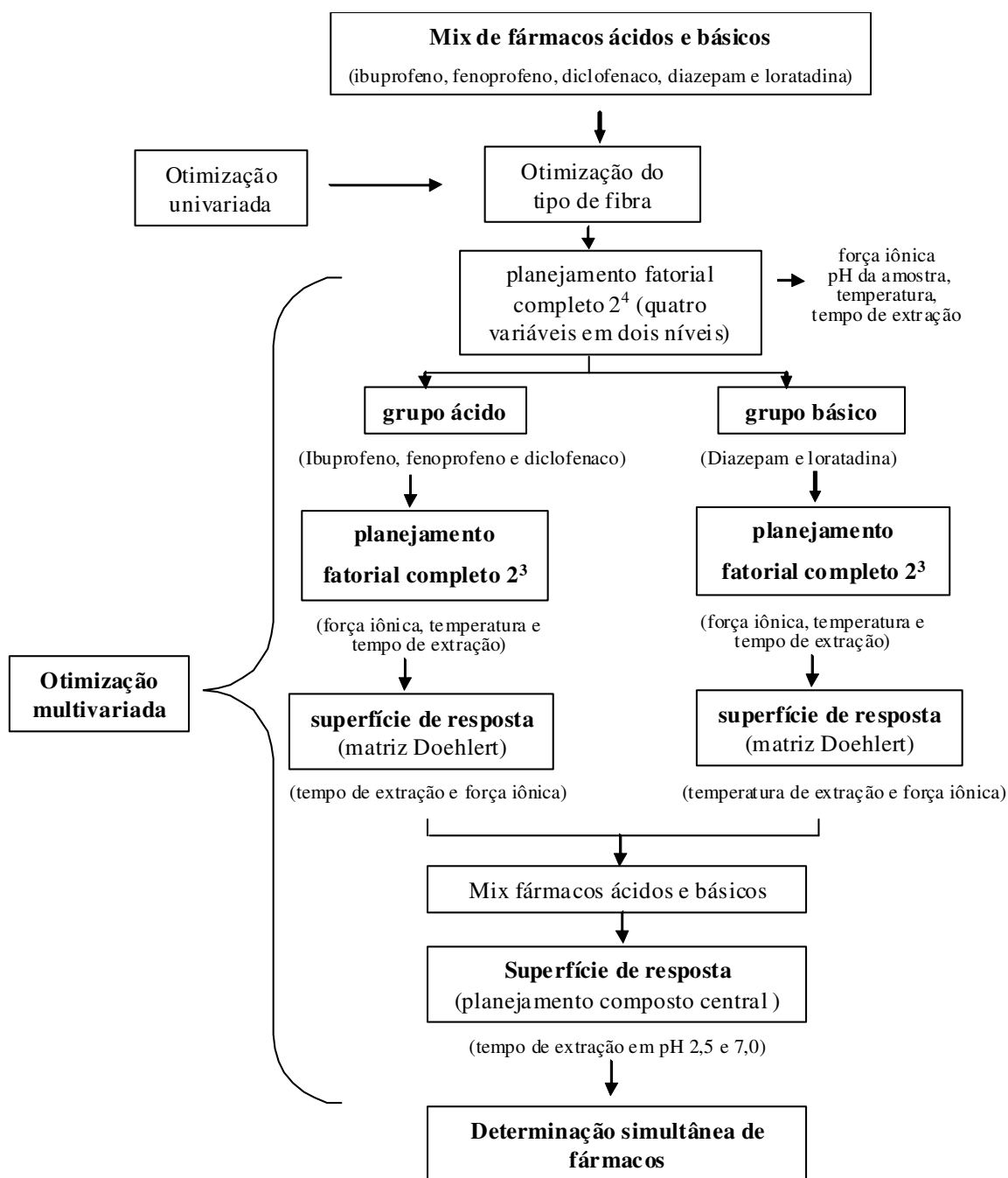


Figura 22: Fluxograma da otimização da metodologia para os três grupos de fármacos estudados. Primeiro grupo (mix de fármacos): metodologia para determinação de ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina; segundo grupo (grupo ácido): metodologia para determinação de ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco; terceiro grupo (grupo básico) metodologia para determinação de diazepam e loratadina.

5.2.2.5 Metodologia analítica para determinação de fármacos

- **Condições de extração para fármacos ácidos:** O pH da amostra foi fixado em 2,5 com base em dados preliminares e foram otimizadas as variáveis força iônica (pela adição de cloreto de sódio), temperatura e tempo de extração.
- **Condições de extração para fármacos básicos:** O pH da amostra foi ajustado em 7,0 e otimizou-se as variáveis força iônica, temperatura e tempo de extração.
- **Condições de extração para fármacos ácidos e básicos em série:** A variável pH da amostra foi alterada durante o procedimento de extração dos analitos. Neste procedimento, a amostra foi submetida à extração em pH 2,5 por um determinado tempo. Após esse período a fibra foi recolhida e o pH da solução foi ajustado para 7,0 (com a adição de 900 μL de solução de fosfato 0,4 mol L^{-1} com pH 9,2) sendo imediatamente a fibra exposta novamente à solução para finalizar a extração. Após o término da extração, a fibra foi lavada rapidamente em água Milli-Q e injetada no GC, permanecendo por 10 minutos no injetor para completa dessorção. A etapa de modificação no pH foi realizada rapidamente com o auxílio de uma seringa não havendo necessidade de abertura do frasco. Na **Figura 23** esta apresentado um fluxograma das etapas na extração de fármacos em série.

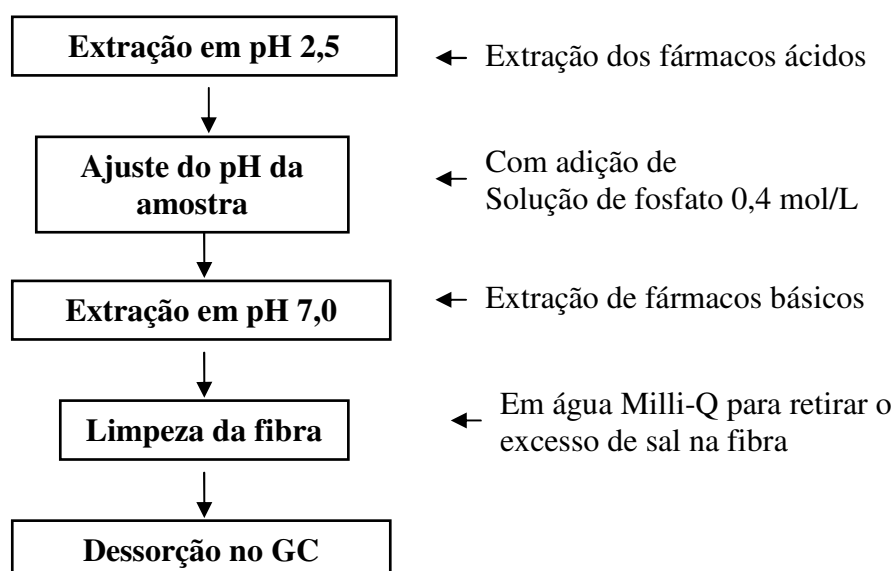


Figura 23: Fluxograma das etapas da extração de fármacos ácidos e básicos simultaneamente.

5.2.2.6 Validação da metodologia

A linearidade foi avaliada analisando-se amostras de água fortificadas em concentrações que variaram de 0,1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, dependendo do fármaco analisado, sendo realizado no mínimo 5 pontos de estudo para cada curva.

LOD foi calculado como sendo 3,3 vezes o desvio padrão (SD) do ruído do branco e dividido pelo coeficiente angular da curva analítica. LOQ foi estimado como sendo 10 vezes o desvio padrão (SD) do ruído (Branco) e dividido pelo coeficiente angular da curva analítica

A recuperação foi calculada nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ibuprofeno e loratadina, 20 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fenoprofeno e diclofenaco e 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diazepam. Esses valores foram comparados com aqueles obtidos no cálculo da linearidade da metodologia, sendo a recuperação expressa como porcentagem da quantidade extraída.

A precisão intra-dia ($n=5$) foi avaliada nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diazepam, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ibuprofeno e loratadina e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fenoprofeno e diclofenaco. A precisão foi expressa como estimativa do desvio padrão relativo (DPR%).

Branco da fibra, do equipamento e de soluções foram realizados periodicamente para verificação de possíveis contaminações durante o procedimento analítico. A especificidade do método foi avaliada através da análise de diferentes amostras de branco (água deionizada e Milli-Q).

A precisão do valor do pH durante a extração em pH 7,0 foi avaliada. O processo de alteração do pH da amostra de 2,5 para 7,0 foi realizado por 7 vezes e foi avaliado o pH resultante da amostra após a adição de fosfato. Avaliações aleatórias do pH entre os experimentos também foi realizado.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência de extração das fibras de SPME foram comparadas utilizando o modo de extração direto, utilizando pH da amostra igual a 2,5, força iônica de 4 g de cloreto de sódio, e temperatura e tempo de extração de 55 °C e 30 minutos, respectivamente. Ao comparar a eficiência de extração das fibras PDMS, CW/DVB, CAR/PDMS, PA e DVB/CAR/PDMS observou-se que as fibras que apresentaram melhor extração foram: fibras DVB/CAR/PDMS e CW/DVB para o composto ibuprofeno; fibra CW/DVB para fenoprofeno; PA para diclofenaco e DVB/CAR/PDMS para loratadina e diazepam. Assim buscando a melhor resposta para o conjunto dos 5 compostos optou-se pela fibra DVB/CAR/PDMS pelo fato desta apresentar os resultados de extração mais homogêneos para os compostos estudados (Figura 24).

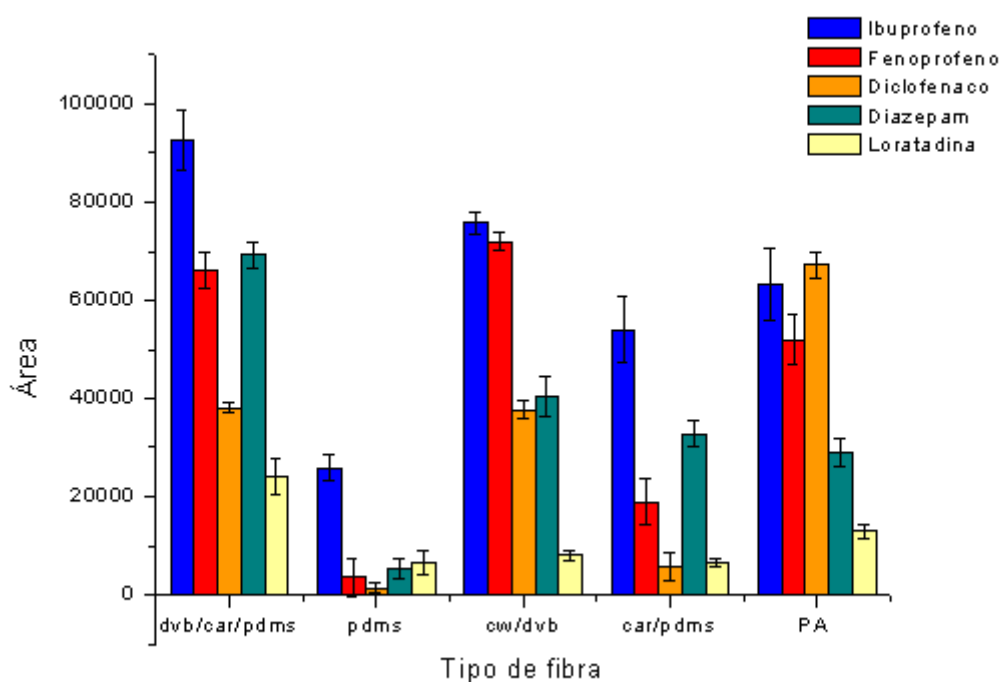


Figura 24: Resultados obtidos para a otimização univariável do tipo de fibra

5.3.1 Otimização multivariada do procedimento de SPME

Em uma investigação preliminar, foi aplicado o planejamento fatorial completo 2^4 para os cinco compostos alvos: ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina. As variáveis estudadas foram força iônica (0, 4,4 e 8,8 g), pH da amostra (2,5, 4 e 5,5),

temperatura (35, 50 e 65 °C) e tempo de extração (20, 30 e 40 min). A partir das respostas cromatográficas obtidas foi calculada a média geométrica, a fim de se obter um compromisso entre as respostas para os cinco compostos e plotar o gráfico de Pareto, apresentado na **Figura 25**.

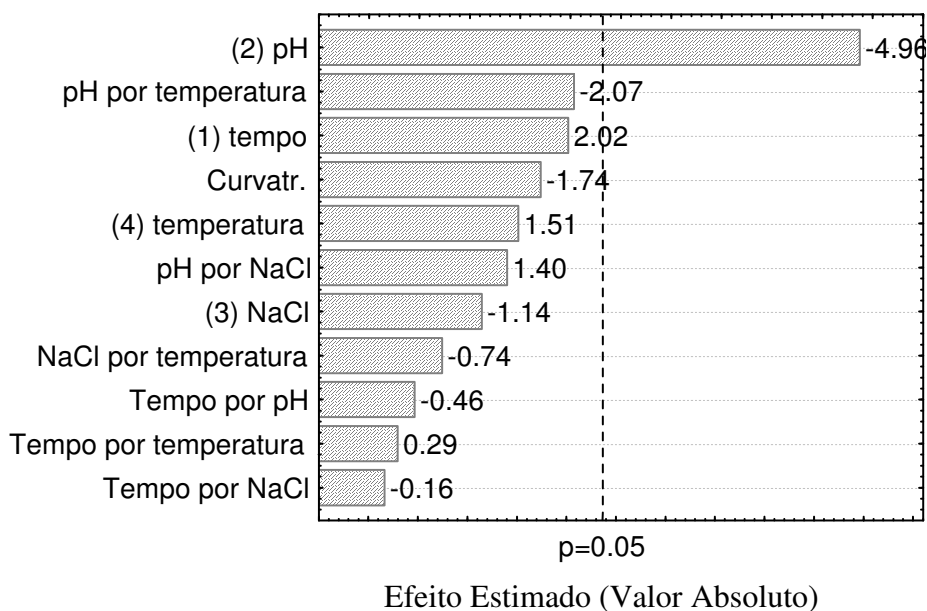


Figura 25: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

O gráfico de Pareto obtido apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,8585. Nesse experimento foi observado que somente a variável pH da amostra mostrou-se significativa e nenhuma das outras variáveis, ou interação entre elas, apresentou significância. Assim, levantou-se a hipótese de que a variável pH poderia estar mascarando a importância dos outros efeitos individuais e também de possíveis interações. Assim, foi realizado um outro estudo para avaliar qual seria a melhor faixa de pH para a extração destes. De acordo com os resultados, pode-se dividir os cinco compostos em dois grupos. Os compostos com características ácidas (ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco) possuem um perfil de extração que tende a melhorar com valores de pH ainda menores que 2,0. Contudo, para aumentar a vida útil da fibra de SPME, optou-se realizar as extrações destes compostos em pH 2,5. Os outros dois compostos com características básicas (diazepam e loratadina) foram melhores extraídos na faixa de pH entre 7,0 e 8,5. Tendo em vista uma posterior extração conjunta dos

cinco compostos, optou-se pelo pH 7,0, o qual facilitaria a mudança de pH pela adição de fosfato, o qual tem a sua melhor capacidade tamponante nesse pH (7,0). Assim, optou-se pela otimização de uma metodologia para cada grupo separadamente, onde a variável pH foi fixada em 2,5 para o grupo de compostos com características ácidas e pH 7,0 para o grupo básico.

5.3.1.1 Otimização multivariada para fármacos ácidos

A otimização dos fármacos ácidos, com o pH da amostra fixado em 2,5, foi realizada com um novo planejamento fatorial completo (2^3), na qual as variáveis estudadas foram força iônica (0, 4,4 e 8,8 g), temperatura (35, 50 e 65 °C) e tempo de extração (20, 30 e 40 min). A **Figura 26** apresenta o gráfico de Pareto (R^2 de 0,9124) gerado a partir deste estudo. Neste gráfico, observa-se que somente a variável tempo de extração foi estatisticamente significativa. As variáveis força iônica e temperatura não foram significativas, assim como não foi observada nenhuma interação significativa entre as variáveis.

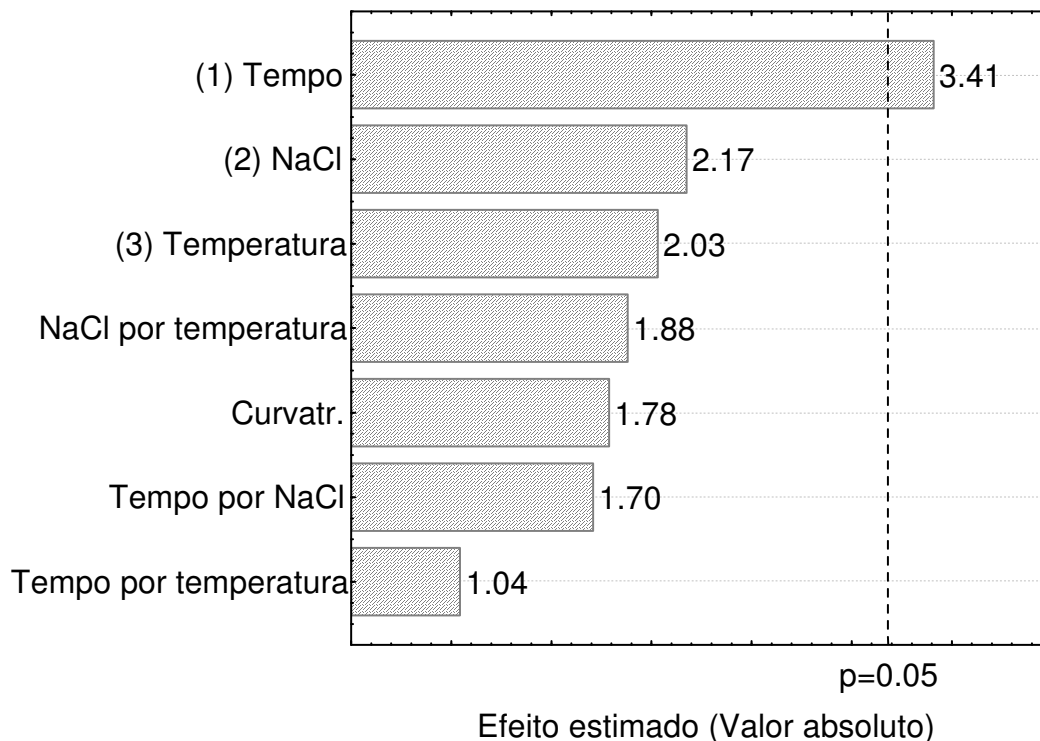


Figura 26: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco.

A partir dos resultados encontrados foi proposta uma superfície de resposta, empregando a matriz Doehlert. As condições de extração foram fixadas em pH 2,5 e temperatura de extração de 50 °C. A superfície de resposta foi aplicada para as variáveis tempo de extração e força iônica. Mesmo a força iônica não apresentando significância, esta se mostrou mais influente na resposta analítica do que a temperatura de extração. A partir dos dados obtidos experimentalmente (**Tabela 22**) foi plotada a superfície de resposta mostrada na **Figura 27** para os fármacos ácidos. Esta superfície de resposta é regida pela equação $R = -105968 + 6483,16x - 316,99x^2 + 5869,21y - 66,19y^2 - 58,88xy$, onde R é a média geométrica das áreas dos picos para os três fármacos avaliados, x e y são o tempo e a força iônica, respectivamente. Através dessa equação calculou-se o ponto de máximo como sendo 6,37 g de sal para a força iônica e 41,5 min para tempo de extração. Assim a metodologia para fármacos ácidos ficou definida como sendo: extração da amostra em pH 2,5, temperatura de 50 °C, força iônica de 6,4 g e tempo de extração de 40,0 min.

Tabela 22: Dados experimentais obtidos pelo planejamento Doehlert para os compostos ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco.

NaCl (g)	Tempo (min)	Altura			Média geométrica
		Ibuprofeno	fenoprofeno	diclofenaco	
5,8	30	61377	41542	8740	28140,7
2,8	35	63069	36251	8951	27352,84
8,8	35	60335	47251	11307	31825,55
5,8	40	79029	57202	14225	40063,6
5,8	40	70590	52990	9656	33055,58
5,8	40	73082	53567	11325	35392,83
2,8	45	73279	43340	11592	33266,64
8,8	45	65583	50268	12141	34206,8
5,8	50	74984	49629	7976	30962,05

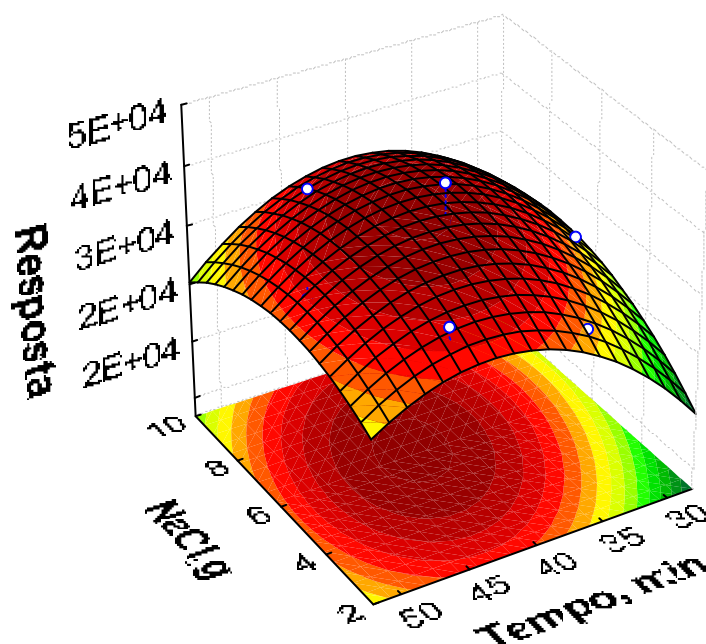


Figura 27: Superfície de resposta obtida através da matriz Doehlert para Ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco.

5.3.1.2. Otimização multivariada para fármacos básicos

Para a otimização da extração dos compostos básicos, também foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3), na qual as variáveis estudadas foram força iônica (0, 4,4 e 8,8 g), temperatura (35, 50 e 65 °C) e tempo (20, 30 e 40 min) de extração. O gráfico de pareto (**Figura 28**) obtido neste estudo apresentou R^2 de 0,9764. Neste gráfico, observa-se que as variáveis independentes nas quais os efeitos são mais relevantes foram temperatura e força iônica. Estas variáveis mostraram-se significativas e indicaram ocorrer um aumento na resposta se estas tenderem para o ponto mais alto estudado. No entanto, observa que a variável temperatura produz um efeito mais significativo que a concentração salina. O tempo não se mostrou significativo, mas indica que com o aumento do tempo há uma pequena melhora na resposta.

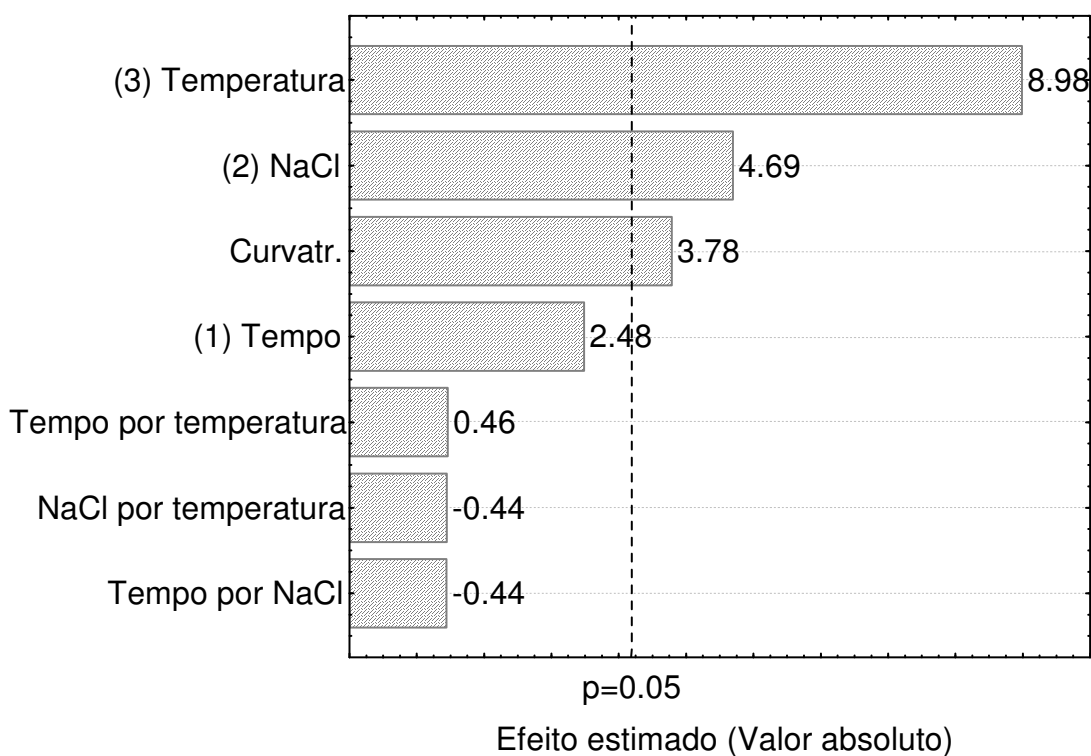


Figura 28: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para diazepam e loratadina.

A partir das duas variáveis significativas indicadas pelo gráfico de Pareto, novamente uma superfície de resposta, empregando a matriz Doehlert, foi realizada. As variáveis fixadas foram pH da amostra em 7,0 e tempo de extração de 30 min. A superfície de resposta foi aplicada às variáveis temperatura e força iônica, sendo os dados experimentais mostrados na **Tabela 23**. Na **Figura 29** é mostrada a superfície de resposta obtida para os fármacos básicos, a qual é regida pela equação $R = -149800 + 5683.21x - 560.81x^2 + 5170.56y - 35.74y^2 + 6.94xy$, onde x e y representam temperatura de extração e força iônica, respectivamente. Através dessa equação pode-se calcular o ponto de máximo como sendo 5,51 g de sal para a força iônica e 72,9°C para a temperatura. Assim a metodologia para fármacos básicos ficou definida como sendo extração em pH 7,0, força iônica de 5,50 g, tempo e temperatura de extração de 30 min e 70 °C, respectivamente.

Tabela 23: Dados experimentais obtidos pelo planejamento Doehlert para os compostos diazepam e loratadina.

NaCl (g)	Temperatura (°C)	Altura		Média Geométrica
		Diazepam	Loratadina	
5,8	50	77080	16169	35303,07
2,8	57,2	57944	30203	41833,99
8,8	57,2	96996	15909	39282,43
5,8	65	100194	28673	53599,09
5,8	65	98404	29317	53711,36
5,8	65	91801	25847	48711,19
2,8	72,5	69197	36071	49960,03
8,8	72,5	113595	20321	48045,44
5,8	80	96153	28793	52616,85

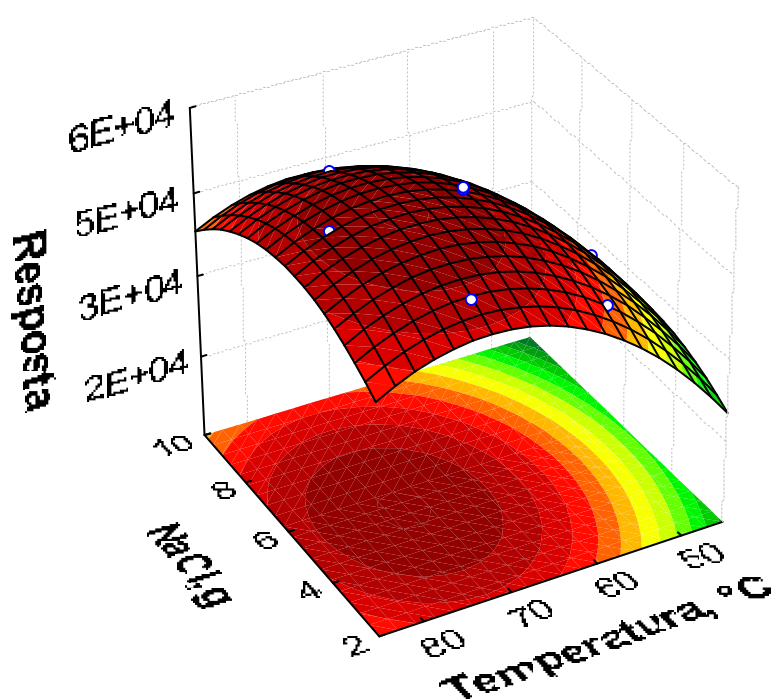


Figura 29: Superfície de resposta obtida através da matriz Doehlert para diazepam e loratadina.

5.3.1.3 Otimização multivariada para a extração de fármacos ácidos e básicos simultaneamente

Com os resultados encontrados nas metodologias para fármacos ácidos e básicos e objetivando uma determinação eficiente dessas duas classes em uma única extração, efetuou-se uma modificação no pH da amostra durante a extração dos analitos, já que estes dois grupos apresentam valores ótimos de pH bem distintos. Para o desenvolvimento dessa nova metodologia unificada, o tempo de extração torna-se de vital importância, pois é necessário avaliar o tempo de extração que a fibra permanecerá em cada etapa (com diferentes valores de pH) sem que esse tempo prejudique a extração do outro grupo, ou seja, o quanto o tempo de extração seria importante para a extração do segundo grupo, mas sem a perda de analitos do primeiro grupo já sorvidos na fibra.

Assim, primeiramente estabeleceu-se um compromisso entre as duas metodologias estudadas para as variáveis força iônica e temperatura. A variável força iônica foi definida em 6 g de cloreto de sódio, pois esse valor se encontra na região de valor máximo observado na superfície de resposta de ambos os grupos. A variável temperatura foi fixada em 65 °C. Embora esse valor seja levemente menor que a temperatura de melhor resposta para os fármacos básicos, justifica-se a sua escolha pelo fato dessa temperatura ainda se encontrar na região de melhor resposta (**Figura 29**). Para os fármacos ácidos a temperatura não foi significativa no intervalo de 35 a 65 °C, justificando assim a temperatura selecionada.

A partir da definição das condições fixadas foi aplicada novamente uma metodologia de superfície de resposta, agora empregando o planejamento composto central. Esse planejamento tem como objetivo verificar a influência do tempo de extração na resposta dos analitos quando estes são submetidos à extração em série, com a alteração do pH da amostra (**Tabela 24**).

A **Figura 30** apresenta a superfície de resposta obtida para a resposta analítica em função do tempo de extração em pH 2,5 e 7,0, representada pela equação $R = -10744 + 3025,55x - 39,39x^2 + 677,36y - 5,78y^2 - 8,64xy$, onde x representa o tempo de extração em pH 2,5 e y tempo de extração em pH 7,0.

Observa-se que o tempo onde ocorre a melhor resposta para os dois grupos é 34,8 minutos em pH 2,5 e 32,5 minutos em pH 7,0, totalizando 67,3 minutos de extração. Visando melhorar a frequência analítica da metodologia, o tempo do segundo grupo foi reduzido a 20 min sem ocasionar perdas significativas na extração desse grupo.

Tabela 24: Dados experimentais obtidos para o planejamento composto central dos cinco fármacos estudados.

Tempo extração pH 2,5	Tempo extração pH 7,0	Média geométrica ¹
14	14	33568,54
14	36	37053,07
36	14	53036,75
36	36	52340,16
10	25	24553,65
40	25	51378,94
25	10	41190,27
25	40	49864,07
25	25	45064,76
25	25	51709,67

¹ média geométrica obtida dos cinco fármacos estudados

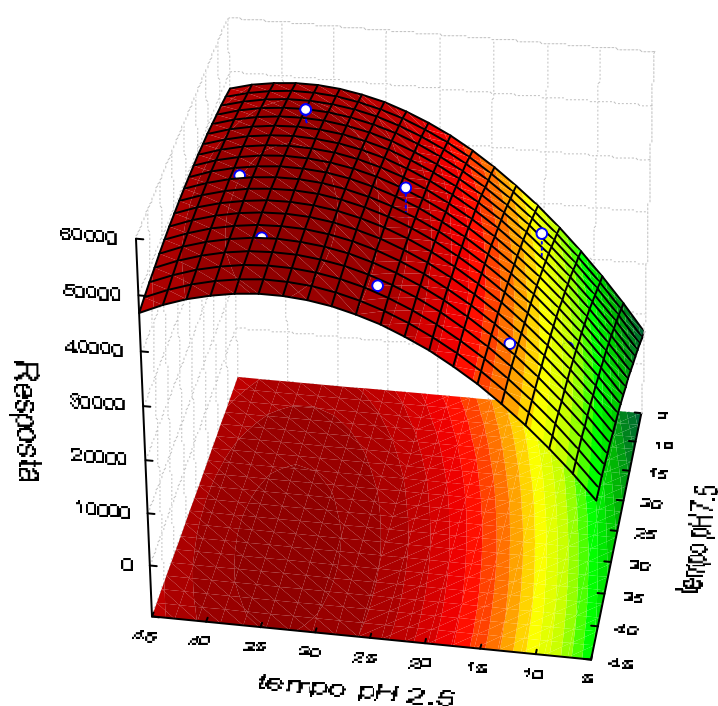


Figura 30: Superfície de resposta obtida através do planejamento Composto Central para os dois grupos avaliados.

A metodologia para determinação de fármacos ácidos e básicos em série ficou definida como sendo: tempo total de extração de 55 min (sendo 35 min em pH 2,5 e 20 min em pH 7,0), força iônica de 6 g de cloreto de sódio e temperatura da amostra de 65 °C.

A variação provocada no valor do pH pela adição de 900 µL da solução de fosfato de sódio foi estudada e, observou-se um desvio padrão de 0,069 entre as leituras de pH realizadas em diferentes amostras (n=7), seguindo o mesmo padrão de adição realizado durante a extração.

5.3.2. Figuras de mérito

Os três métodos analíticos propostos foram avaliados para verificar a sua aplicabilidade em amostras de água. Faixa linear, coeficiente de correlação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram determinados para as três metodologias. A recuperação e a repetibilidade foi realizada somente na metodologia para determinação de fármacos ácidos e básicos em série. O limite de detecção foi calculado como sendo 3,3 vezes o desvio padrão (SD) do ruído e dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

Na **Tabela 25** estão apresentados os parâmetros analíticos obtidos para as 3 metodologias otimizadas. Observam-se bons coeficientes de correlação (acima de 0,9957) em todos os casos.

Os valores de LOD encontrados mostram que a otimização para a metodologia de fármacos ácidos e básicos em série foi eficiente, pois ocorreu um mínimo de perda na extração dos fármacos ácidos (com exceção do diclofenaco que melhorou seu LOD). Quanto aos fármacos básicos, o diazepam apresentou uma sensível melhora, provavelmente pelo fato deste também ser extraído em pH ácido, e a loratadina apresentou somente um ligeiro aumento no valor de seu LOD.

Para os fármacos ácidos, os valores de limite de quantificação ficaram 0,19, 0,29 e 1,74 ng mL⁻¹ para ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco, respectivamente. Na metodologia para os compostos básicos, diazepam e loratadina ficaram com LOQ de 0,10 e 0,05 ng mL⁻¹, respectivamente. Observando e comparando os valores encontrados na terceira metodologia, para fármacos ácidos e básicos em série, observa-se que os valores de LOQ foram muito semelhantes. Para o ibuprofeno passou de 0,19 para 0,34 ng mL⁻¹; fenoprofeno de 0,29 para 0,34 ng mL⁻¹; diclofenaco de 1,74 para 1,43 ng mL⁻¹; diazepam de 0,10 para 0,05 ng mL⁻¹ e loratadina de 0,05 para 0,07 ng mL⁻¹.

Tabela 25: Figuras de mérito obtidas nas 3 metodologias estudadas, incluindo limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear e coeficiente de correlação (R).

Compostos	LOD, ng mL ⁻¹	LOQ, ng mL ⁻¹	Intervalo, ng mL ⁻¹	R
<i>Metodologia para fármacos ácidos</i>				
Ibuprofeno	0,06	0,19	0,5 - 50	0,9974
Fenoprofeno	0,09	0,29	0,5 - 50	0,9957
Diclofenaco	0,52	1,74	2,0 - 50	0,9991
<i>Metodologia para fármacos básicos</i>				
Diazepam	0,03	0,10	0,1 - 25	0,9996
Loratadina	0,01	0,05	0,1 - 25	0,9990
<i>Metodologia para fármacos ácidos e básicos em série</i>				
Ibuprofeno	0,10	0,34	0,5 - 40	0,9981
Fenoprofeno	0,10	0,34	0,5 - 45	0,9982
Diclofenaco	0,43	1,43	2,0 - 40	0,9970
Diazepam	0,02	0,05	0,1 - 20	0,9998
Loratadina	0,02	0,07	0,1 - 35	0,9962

Melhores limites de detecção e quantificação têm sido reportados na literatura para os compostos ácidos quando é introduzida a etapa de derivatização antes da detecção por CG-MS ou CG-MS-MS [32, 16, 29, 50, 149]. Essa redução na polaridade melhora as propriedades cromatográficas e a detectabilidade da detecção, mas também introduz uma etapa trabalhosa e longa na análise [30]. Para o composto ibuprofeno, valor semelhante de LOQ foi encontrado quando este foi determinado por SPE e CG-MS-MS sem derivatização [52]. O resultado obtido para diazepam foi semelhante aos encontrados em outros trabalhos, nos quais foram obtidos valores de LOQ de 22 e 20 ng L⁻¹ em água de superfície [09,150] e 63 e 100 ng L⁻¹ em efluente de estação de tratamento de esgoto [09,149]. A loratadina é reportada em poucos trabalhos ambientais sendo apresentado LOQ de 7, 10 e 11 ng L⁻¹ em água de superfície, efluente de ETE e influente de ETE, respectivamente, quando analisada por SPE e LC-MS-MS [151].

5.3.3 Aplicação da metodologia para determinação de fármacos ácidos e básicos simultaneamente em amostras reais.

Foram estudadas duas amostras provenientes de efluente de estação de tratamento de esgoto e uma amostra de esgoto não tratado. Como os analitos estudados não foram detectados nas amostras, foram realizados estudos de recuperação, em triplicata, através de fortificação artificial (dois níveis de fortificação para cada composto) destas amostras antes da extração. Os valores de recuperação encontrados neste estudo estão apresentados na **Tabela 26**, sendo que a recuperação encontrada ficou na faixa de 67 a 120 % para os cinco analitos. O composto que apresentou os menores valores de recuperação foi o diclofenaco, mesmo assim, os resultados estão dentro da faixa aceitável, com exceção do valor de 67 %.

Tabela 26: Recuperação e estimativa do desvio padrão relativo (RSD) encontrados nas 3 amostras estudadas, sendo duas de efluente de estação de tratamento de esgoto (ETE¹ e ETE²) e uma de água de esgoto não tratado.

Composto	Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperações ± RSD, %		
		Efluente ETE ¹	Água de esgoto	Efluente ETE ²
Ibuprofeno	10	115 ± 4	92 ± 3	92 ± 10
	20	87 ± 3	89 ± 10	88 ± 5
Fenoprofeno	20	89 ± 3	94 ± 6	79 ± 2
	30	108 ± 4	73 ± 3	114 ± 9
Diclofenaco	20	70 ± 12	70 ± 6	67 ± 12
	30	110 ± 12	87 ± 11	70 ± 13
Diazepam	5	94 ± 13	97 ± 15	85 ± 13
	10	101 ± 16	92 ± 7	91 ± 9
Loratadina	10	103 ± 0,5	103 ± 8	103 ± 1
	20	120 ± 11	98 ± 13	115 ± 12

Na literatura, quando usado a técnica de SPME para extração em água, foram encontrados valores para o fármaco ibuprofeno maiores que 70% e de 74-119 % [44,65], já para diclofenaco as recuperações foram de 73 a 110 % [65]. Os resultados encontrados para a recuperação são concordantes com outros trabalhos, mesmo utilizando técnicas de preparo de amostra diferente.

Quando aplicada à técnica de LPME para a determinação desses compostos em água foram obtidas recuperações de 86, 82 e 111% para ibuprofeno, fenoprofeno e diclofenaco, respectivamente [152].

Com a técnica de SPE são verificadas recuperações na faixa de 90-115% para diclofenaco, ibuprofeno e diazepam em água residual [153]; recuperação em água de torneira e superfície de 73 e 99% para diazepam, 70% em ambas as matrizes para diclofenaco, 71 e 99% para o fenoprofeno e 67 e 110% para o ibuprofeno [150]; recuperação em efluente de estação de tratamento de esgoto de 105, 99 e 90% para diclofenaco, diazepam e ibuprofeno [149] e também de 83 (12)% para ibuprofeno e 88 (13)% para diclofenaco [30]. Para o fármaco loratadina foram encontradas recuperações de 72 (9), 86 (12) e 115 (3)% para água de superfície, efluente de ETE e influente de ETE, respectivamente [151].

O RSD obtido na avaliação da precisão variou de 4,6 a 14,5% para os cinco compostos estudados. Foram encontradas repetibilidades de 4,6; 12,1; 6,2; 13,5 e 14,5 % para ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina, respectivamente. Todos os resultados encontrados apresentaram valores menores que 20%, assim a precisão do método pode ser considerada adequada.

5.4. CONCLUSÃO PARCIAL

A otimização utilizando o planejamento fatorial completo e a metodologia de superfície de resposta mostrou ser uma ferramenta eficaz, possibilitando uma otimização completa e rápida, e fornecendo resultados mais confiáveis comparados à clássica otimização univariada.

Três metodologias foram propostas nesse trabalho e ambas podem ser aplicadas com sucesso na análise dos compostos estudados, sobretudo a metodologia proposta para determinação de fármacos ácidos e básicos simultaneamente, ou seja, em uma única extração. Essa modificação do pH durante a extração mostrou-se extremamente eficiente, pois permitiu a extração de compostos com diferentes características físico-químicas. Esse procedimento pode ser facilmente estendido para análise de outros grupos ácidos e básicos.

CAPÍTULO 6

Conclusão Geral

CONCLUSÃO GERAL

A análise quantitativa em química analítica representa uma importante etapa na determinação da relação funcional entre valores medidos e grandezas analíticas, caracterizando os tipos de analitos e suas quantidades ou concentrações. Na análise de fármacos em fluido biológico, analisando o resultado da comparação das técnicas convencionais de padronização externa e adição do analito com o método proposto de padronização por adição, foi possível verificar que a técnica proposta foi equivalente às técnicas convencionais. Assim, a padronização por adição mostrou-se de confiança e apresentou vantagens tais como simplicidade, economia, requisição de pouco reagente e mostrou-se mais rápida que as demais técnicas estudadas. Portanto, ela é mais uma opção para a quantificação desses fármacos em fluidos biológicos, além de fornecer o indício de ser estendida para outros compostos.

Neste trabalho foram testadas duas diferentes técnicas de preparo de amostra ambiental para determinação de fármacos e cada uma com as suas particularidades permitiu obter bons resultados para as metodologias estudadas. Considerando a importância no mundo de hoje em se trabalhar com procedimentos analíticos envolvendo técnicas menos poluidoras, minimizando a produção de resíduos para o meio ambiente e também evitando a exposição dos analistas por longo tempo a solventes tóxicos, as técnicas escolhidas mostraram-se uma excelente opção para essas análises.

Para a otimização dos parâmetros experimentais foi usada a tradicional técnica univariada e também a multivariada e estas com as suas vantagens e desvantagens forneceram resultados importantes sobre as variáveis que iriam interferir no resultado do estudo, permitindo assim uma otimização adequada e eficiente dos analitos estudados. Salientando a importância de analisar as interações entre as variáveis na análise multivariada e também a facilidade de interpretação dos resultados na análise univariada.

Quanto à metodologia onde foi aplicada a SPE para determinação de fármacos, foi possível realizar uma otimização adequada e obter uma boa condição de extração para estes compostos, apesar dos resultados de validação serem apenas satisfatórios. No entanto, esta metodologia otimizada aliada a detectores mais sensíveis pode ser usada para melhorar a detectabilidade do método.

Através da otimização multivariada para a metodologia de determinação de fármacos com características ácidas e básicas simultaneamente, foi possível otimizar três metodologias para fármacos ácidos e básicos separadamente e para os dois grupos simultaneamente. Ambas

podem ser aplicadas com sucesso na análise dos compostos estudados, sobretudo a metodologia proposta para determinação de fármacos ácidos e básicos simultaneamente, que se mostrou extremamente eficiente, pois permitiu a extração de compostos com diferentes características físico-químicas. Esta mudança de pH foi realizada visando um único procedimento de extração para compostos com diferentes características físico-químicas, buscando a maior eficiência de extração para ambas as classes. Uma consideração importante é que essa modificação do pH durante a extração pode ser estendida para análise de outros grupos ácidos e básicos que geralmente são analisados priorizando um determinado grupo de compostos em detrimento de outro.

Considerando o pequeno número de trabalhos brasileiros que tem como finalidade a análise de fármacos em matrizes ambientais, este trabalho espera ter chamado a atenção para estes compostos ainda pouco conhecidos e estudados como contaminantes no meio ambiente e que este possa ser um incentivo a novos pesquisadores.

Referências Bibliográficas

1. VERENITCH, S. S.; LOWE, C. J.; MAZUMDER, A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1116, p. 93–203, 2006.
2. HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466-485, 2007.
3. GREENWOOD, R.; MILLS, G. A.; ROIG, B. Introduction to emerging tools and their use in water monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 263-267, 2007.
4. BARCELÓ, D. Pharmaceutical-residue analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 454-455, 2007.
5. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of chromatography A**, v. 1152, n. 2, p. 97-115, 2007.
6. HEBERER T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 5–17, 2002.
7. XIU-SHENG, M.; KOENIG, B. G.; METCALFE, C. D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 139–147, 2002.
8. BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment- a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, p. 1143-1155, 2004.
9. TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419-434, 2001.
10. CASTIGLIONI, A.; FANELLI, R.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; ZUCCATO, E. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.39, p. 25-32, 2004.
11. HALLING-SORENSEN, J. B.; NORS N. S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN L.H.C.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review. **Chemosphere**, v. 36, n.2, p. 357-393, 1998.
12. HILTON, M. J.; THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid

- chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 129–141, 2003.
13. BILLA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
 14. STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BRAUMANN, V. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.
 15. HEBERER, T.; DUNNBIER, U.; REILICH, C.; STAN, H. J. Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. In: Koutsouba, V. et al. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 51, p. 69 -75, 2003.
 16. KOUTSOUBA, V.; HEBERER, T.; FUHRMANN, B.; SCHMIDT-BAUMLER, K.; TSIPI, D.; HISKIA, A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 51, p. 69 -75, 2003.
 17. JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.
 18. WENZEL, A.; SCHAFERS, C. A.; SCHIMITZ, V. V. Research efforts towards the identification of endocrine disrupting chemicals. In: TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in analytical chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419, 2001.
 19. HIGNITE, C.; AZAZNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic in sewage water effluent. In: Koutsouba, V. et al. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 51, p. 69 -75, 2003.
 20. BUSSER, H. R.; MULLER, M. D.; THEOBALD, N. Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 188-192, 1998.
 21. BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **The Science of the Total Environment**, v. 311, p. 135 –149, 2003.

22. ANDREOZZI, R.; MAROTTA, F.; PAXEUS, N. Pharmaceuticals in STP e effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, v. 50, p. 1319-1330, 2003.
23. RODRIGUES, I.; QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; CELA, R. Determination of drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 265-274, 2003.
24. TERNES, T. A. Occurrence of drugs in Germany sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.
25. HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 109-118, 1999.
26. TERNES, T.A.; KRECKEL, U. P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 91-99, 1999.
27. BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 772–783, 2006.
28. PETROVIC, S.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, 2003.
29. TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; HOLADY, J. C.; REXING, D. J.; SNYDER, S. A. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, p. 1990–1998, 2006.
30. GÓMEZ, J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGUERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, p. 993–1002, 2007.
31. WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient

- (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 183–195, 2004.
32. OLLERS, S.; SINGER, H. P.; FASSLER, P.; MULLER, S. R. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. **Journal of Chromatography A**, v. 911, p. 225–234, 2001.
 33. TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 175–185, 2001.
 34. YANG, S.; CARLSON, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, v. 37, p. 4645–4656, 2003.
 35. PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 494–5146, 2007.
 36. ROBERTS, P. H.; BERSUDER, P. Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, p. 143–150, 2006.
 37. MOLDOVAN, Z. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. **Chemosphere**, v. 64, p. 1808–1817, 2006.
 38. GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. 190 f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
 39. WEIGEL, S.; BESTER, K.; HUHNERFUSS, H. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 151–161, 2001.
 40. THOMAS, K. V.; HILTON, M. J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436–444, 2004.
 41. LÖFFLER, D.; TERNES, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 133–144, 2003.

42. DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, p. 912-930, 1999.
43. ZUCCATO, E.; CALAMARI, D.; NATANGELO, M.; FANELLI, R. Presence of therapeutic drugs in the environment. **The Lancet**, v. 355, n. 9217, p. 1789–1790, 2000.
44. MOEDER, M.; SCHRADER, S.; WINKLER, M.; POPP, P. Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 95–106, 2000.
45. FARRE, M.; FERRER, I.; GINEBREDÀ, A.; FIGUERAS, M.; OLIVELLA, L.; TIRAPU, L. C.; VILANOVA, M.; BARCELO, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 187–197, 2001.
46. KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.
47. SOLIMAN, M. A.; PEDERSEN, J. A.; SUFFET, I. H. Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 223–237, 2004.
48. KOSJEK, T.; HEATH, E.; KRBAVCIC, A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. **Environment International**, v. 31, n. 5, p. 679-685, 2005.
49. BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 195-204, 2005.
50. TAUXE-WUERSCH, A.; ALENCASTRO, L.F.; GRANDJEAN, D.; TARRADELLAS, J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. **Water Research**, v. 39, p. 1761-1772, 2005.
51. NAKADA, N.; TANISHIMA, T.; SHINOHARA, H.; KIRI, K.; TAKADA, H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and

- their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, p. 3297–3303, 2006.
52. GÓMEZ, M.J.; AGUERA, A.; MEZCUA, M.; HURTADO, J.; MOCHOLÍ, F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography–tandem mass spectrometry in wastewater. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 314-320, 2007.
 53. TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.
 54. KOT-WASIK, A.; DEBSKA, J.; NAMIESŃNIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 557-568, 2006.
 55. KNACKER, T. Preliminary Environmental Risk EMEA em Assessment (ERA) for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) ECT Oekotoxikologie GmbH 65439 Flörsheim am Main Germany, 2003.
 56. ARIESE, F.; WILFRIED H.O. E.; DICK T.H.M.; SIJM C. Natural and synthetic organic compounds in the environment a symposium report. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 65–80, 2001.
 57. MULLER, J. J. A. Toxicological limits of medicines in drinking-water. RIVM Rapport 703719004, p.35-45, 2002. Disponível em: <www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten>. Acesso em 10 maio 2006.
 58. KOROLKOVAS, Andrejus; BURCKHALTER, Joseph H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S. A., 1988. 783 p.
 59. SWEETMAN, Sean C, Harns, M. R. P. **Martindale, The Complete Drug Reference**. 33. ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. 2473 p.
 60. MOFFAT, Anthony C.; OSSELTON, David, M.; WIDDOP, Brian. **Clarcke's analysis of drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 564 p.
 61. KOROLKOVAS, Andrejus; FRANÇA, Francisco Faustino de A. Carneiro. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. ed. 2001/2002. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S. A., 2001.

62. USP. **Farmacopéia Americana**, USP 25, 2002, 2675 p.
63. QIN, Y.; WANG, X. B.; WANG, C.; ZHAO, M. ; WU, M. T.; XU, Y. X.; PENG, S. Q. Application of high-performance liquid chromatography–mass spectrometry to detection of diuretics in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 794, p. 193-203, 2003.
64. WADA. World Anti-doping Agency. Disponível em: <www.wada-ama.org>. Acesso em janeiro 2004.
65. CARPINTEIRO, J.; QUINTANA, J.B.; MARTÍNEZ, E.; RODRÍGUEZ, I.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A.; CELA, R. Application of strategic sample composition to the screening of anti-inflammatory drugs in water samples using solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, p. 61-71, 2004.
66. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S. A., 2001. 703 p.
67. FONSECA, Almir. **Interações medicamentosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora De publicações Biomédicas Ltda, 2000. 516 p.
68. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Review Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122–159, 2006.
69. HAO, C.; ZHAO, X.; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 569-580, 2007.
70. BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 129–139, 2007.
71. HENNION. M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.
72. CHEN, C.; WEN, T.; WANG, G.; CHENG, H.; LIN, Y.; LIEN, G. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 352–365, 2007.
73. RODRIGUES, J.; CARPINTEIRO, J.B.; QUINTANA, A. M.; CARRO, R. A.; LORENZO, R. C. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the

- analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 1–8, 2004.
74. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs- Review. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17-63, 2000.
75. HALL, B. J.; BRODBELT, J. S. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of cromatography A**, v. 777, p. 275-282, 1997.
76. WEN, Y.; ZHOUB, B.; XUB, Y.; JIN, S.; FENG, Y. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 21–28, 2006.
77. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos encontrados em Fluidos Biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.
78. LANÇAS, F. M. **Extração em Fase sólida (SPE)**. São Carlos: Editora RiMa, 2004. 96 p.
79. QUEIROZ, S. C. N. **Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em espectrometria de massas e novos sorventes para fase sólida**. 2001. 162f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
80. ULRICH, S.; MARTENS, J. Chromatography assay Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid and nitrogen-phosphorus selective detection for the of antidepressant drugs in human plasma. [Journal of cromatography B](#), v. [696](#), p. 217-234, 1997.
81. MAJORS, R. LC-GC. In: LANÇAS Fernando M. **Extração em Fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.
82. PHENOMENEX. **SPE Reference Manual & Users Guide**. Part n. AA0-6067. 62 p.
83. FIEHN, O.; JEKEL, M. Comparison of Sorbents Using Semipolar to Highly Hydrophilic Compounds for a Sequential Solid-Phase Extraction Procedure of Industrial Wastewaters. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3083-3089, 1996.

84. TERNES, T. A.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 175–185, 2001.
85. TERNES, T. A.; STUMPF, M.; SCHUPPERT, B.; HABERER, K. **Vom Wasser**, v. 90, p. 295, 1998. In: RODRIGUES, J. et al. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 1–8, 2004.
86. SNOW, N. H. Solid phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 445-455, 2000.
87. WALLES, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 85-92, 2004.
88. THEODORIDIS, G.; LONTOU, M. A.; MICHPOULOS, F.; SUCHA, M.; GONDOVA, T. Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography Application in the analysis of pharmaceuticals in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 516, p. 197-20, 2004.
89. MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1015–1024, 2005.
90. VOLMER, D. A.; HUI, J. P. M. Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, v.11, p. 1926 – 1934, 1996.
91. IWAI, M.; HATTORI, H.; ARINOBU, T.; ISHII, A.; KUMAZAWA, T.; NOGUCHI, H.; SUZUKI, O.; SENO, H. Simultaneous determination of barbiturates in human biological fluids by direct immersion solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 806, p. 65–73, 2004.
92. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. Review. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 167–194, 2000.

93. STAERK, U.; KÜLPMANN, W. R. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 399–411, 2000.
94. HUPPERT, N.; WÜRTELE, M.; HAHN H. Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME). **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 362, p. 529-536, 1998.
95. CARPINTEIRO, J.; QUINTANA, J.B.; RODRIGUEZ, I.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A.; CELA, R. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, p. 179–185, 2004.
96. BRAUN, P.; MOEDER, M.; SCHRADER, S.; POPP, P.; KUSCHK, P.; ENGEWALD, W. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 988, p. 41–51, 2003.
97. MICHULEC, M.; WARDENCKI, W. Development of headspace solid-phase microextraction gas chromatography method for the determination of solvent residues in edible oils and pharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 119–124, 2005.
98. CHEN, J.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction Coupled to HighPerformance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2530-253, 1995.
99. ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1843-1852, 1993.
100. MESTER, Z.; STURGEON, R.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p. 233-260, 2001.
101. MARTOS, P. A.; PAWLISZYN, J. Calibration of Solid Phase Microextraction for Air Analyses Based on Physical Chemical Properties of the Coating. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 206-215, 1997.
102. SUPELCO. SPME applications Guide. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8700/8652.pdf>>. Acesso em: 06 julho 2006.

103. ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3–14, 2000.
104. PAWLISZYN, Janusz. **Applications of Solid Phase Microextraction**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. 655 p.
105. GDRECKIT, T.; PAWLISZYN, J. Sample Introduction Approaches for Solid Phase Microextraction /Rapid GC. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3265-3274, 1995.
106. SMITH, R. M. Before the injection- modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3–27, 2003.
107. SNYDER, Loyd R; KIRLAND, J.J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2. ed. Nova York: Ed. John Wiley & Sons, 1979. 863 p.
108. LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. 278 p.
109. RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 2, n. 5, p. 771-780, 2004.
110. SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 79-84, 2001.
111. DUTRA, R. L. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de zinco(II) em plasma, eritrócitos e urina de 24 horas por espectrometria de absorção atômica em chama e posterior correlação com atividade física e dislipidemia usando análise quimiométrica**. 2005. 138 f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
112. VIEIRA, M. A.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 2057-2067, 2002.
113. KRUG, F. J.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, P.V. Determination of lead in blood by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 50, p. 1469-1474, 1995.
114. BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. D. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1995. 404 p.

115. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
116. PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Nota técnica Eng. Sanitária e ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
117. PENTEADO, J. C. P. **Desenvolvimento e Aplicação do método Analítico para determinação de LAB em detergentes por SPME-GC/MS**. 2005. 125 f.. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
118. FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061–1067, 2004.
119. LUNDSTEDT, T. et al. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 42, n. 3, 1998. In: TEÓFILO, R. F. et al. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
120. BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando espectrometria de absorção atômica com chama**. 2003. 95 f.. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade federal da Bahia, Salvador, 2003.
121. MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Maringá**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.
122. LANÇAS, Fernando M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 46 p.
123. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01-03/2003.
124. ANVISA. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência para a acreditação**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004. 80 p.
125. ANVISA – Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003.

126. INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Guideline for Industry Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures, 1995.
127. INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Guidance for Industry Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: 15 agosto 2005.
128. INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 3. ed. Riode Janeiro: INMETRO, 2003. 75 p.
129. VERTZONI, M. V.; ARCHONTAKI, H. A.; GALANOPOULOU, P. Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of acetaminophen and its major metabolites in rabbit plasma and urine after a toxic dose. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 487-493, 2003.
130. JENSEN, L. S.; Valentine, J.; Milne, R. W.; Evans, A. M. The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 3, p. 585-593, 2004.
131. AQEL, W.; ABU-QARE, B.; ABOU-DONIA, M. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 939-947, 2001.
132. RAZAK, O. A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 433-440, 2004.
133. FERRARO, M. C. F.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1121-1131, 2002.
134. WANG, Q.; DING, F.; LI, H.; HE, P.; FANG, Y. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1507-1514, 2003.

135. DINÇ, E.; BALEANU, D. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 715-723, 2002.
136. ERK, N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 603-611, 2001.
137. FARTHING, D.; FAKHRY, I.; RIPLEY, E. B. D.; SICA, D. Simple method for determination of hydrochlorothiazide in human urine by high performance liquid chromatography utilizing narrowbore chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 1455-1459, 1998.
138. ERK, N. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p. 195-201, 2003.
139. HERTZOG, D. L.; MCCAFFERTY, J. F.; FANG, X.; TYRRELL, R. J.; REED, R. A. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 747-760, 2002.
140. ERTURK, S.; CETIN, S. M.; ATMACA, S. Simultaneous determination of moexipril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 505-511, 2003.
141. BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para Calibração em Química Analítica – Parte I Fundamentos e Calibração com um Componente (Calibração Univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.
142. SANTOS, J. L. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. **Analytica Chimica Acta**, v. 550, p. 116–122, 2005.

143. ZHONGE, M.; WU, Q.; LEE, Y. W. D.; TRACY, M.; LUKAS, S. E. Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 823, p. 08–114, 2005.
144. FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 4–31, 2007.
145. GIACOMETTI, J.; MILOSEVIC, A.; MILIN, C. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 976, p. 47–54, 2002.
146. YU, Z.; PELDSZUS, S.; HUCK, P. M. Optimizing gas chromatographic–mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 65–77, 2007.
147. WARDENCKI, W.; CURYŁO, J.; NAMIEŚNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal Biochemistry Biophysical Methods**, v. 70, p. 275–288, 2007.
148. BALAKRISHNAN, V. K.; TERRY, K. A. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 1–10, 2006.
149. CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, p. 2918–2926, 2004.
150. QUINTANA, J. B.; RODIL, R.; REEMTESMA, T. Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. **Journal of Chromatography A**, v. 1061, p. 19–26, 2004.
151. GROS, M. P.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, p. 678–690, 2006.

152. QUINTANA, J. B.; RODIL, R.; REEMTSMA, T. Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. **Journal of Chromatography A**, v. 1061, p. 19–26, 2004.
153. GONZÁLEZ-BARREIRO, C. M.; LORES, M.C.; CASAIS, R. Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography–post-column photochemically induced fluorimetry. **Journal of Chromatography A**, v. 993, p. 29-37, 2003.